

Université de Montréal

**Caractérisation de la translocation (12;13)(p12 ;q12-14) et
l'insertion (X;6)(p11.23 ;q21q23.3) dans des leucémies aiguës
pédiatriques**

Par

Riwa Absi

Sciences Biomédicales

Faculté des études supérieures et postdoctorales

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

mai, 2011

© Riwa Absi, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation de la translocation (12;13)(p12 ;q12-14) et
l'insertion (X;6)(p11.23 ;q21q23.3) dans des leucémies aiguës
pédiatriques**

Présenté par :

Riwa Absi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Natalie Patey
Président-rapporteur

Raouf Fetni
Directeur de recherche

Emmanuelle Lemyre
Co-directrice

Hervé Sartelet
Membre du jury

RÉSUMÉ

Par une stratégie de dépistage combinant le caryotype et l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), une insertion (X;6) présente chez des jumelles avec une leucémie myéloïde aiguë (LMA) et une translocation (12;13) dans deux cas de LMA et un cas de leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) ont été mis en évidence. L'insertion (X;6) n'est pas rapportée et serait un variant de la translocation (X;6) rapportée dans 4 cas de LMA, dont un associe un gène de fusion *MYB-GATA1*. Nous avons mis en évidence la dérégulation de l'expression de ces gènes dans le cas d'insertion sans la présence de fusion *MYB-GATA1*. De plus, dans le premier cas de translocation (12;13) identifié, *ETV6* serait fusionné à *CDX2* ou *FLT3*. Le deuxième cas associe la délétion des gènes *miR-15a* et *miR-16-1* à une fusion d'*ETV6* et le troisième cas impliquerait une fusion *ETV6-FOXO1*.

Mots-clés : cytogénétique, caryotype, chromosomes, leucémie aiguë pédiatrique, réarrangements chromosomiques, insertion, translocation, FISH.

ABSTRACT

By a screening strategy combining standard cytogenetics and fluorescent *in situ* hybridization (FISH), an insertion (X;6) in twins with acute myeloid leukemia (AML) and a translocation (12;13) in 2 cases of AML and a case of acute lymphoblastic leukemia (ALL) have been identified. Insertion (X;6) is not reported and could be a variant of translocation (X;6) described in 4 cases of AML, one of which is associated with a *MYB-GATA1* fusion gene. We have identified the disruption of *MYB* and *GATA1* in the insertion but no *MYB-GATA1* fusion seems to be present. Other mechanisms could be in play for the disruption of these genes' expression. Moreover, in the first case of translocation (12;13) identified, *ETV6* is fused to either *CDX2* or *FLT3*. The second case associates the deletion of *miR-15a* and *miR-16-1* genes to an *ETV6* fusion. In the third case, an *ETV6-FOXO1* fusion seems to be involved.

Keywords: cytogenetics, karyotype, chromosomes, acute pediatric leukemia, chromosomal rearrangement, insertion, translocation, FISH

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii
CHAPITRE I : INTRODUCTION	14
1. LEUCÉMIE AIGUË	15
1.1. Hématopoïèse normale.....	15
1.2. Leucémogénèse.....	18
1.3. Classification des leucémies aiguës	19
1.3.1. La leucémie lymphoblastique aiguë.....	19
1.3.1.1. La classification FAB	19
1.3.1.2. La classification de l’OMS	20
1.3.1.2.1. Leucémie lymphoblastique aiguë de type B	20
1.3.1.2.2. Leucémie lymphoblastique aiguë de type T.....	21
1.3.2. La leucémie myéloïde aiguë	21
1.3.2.1. La classification FAB	21
1.3.2.2. La classification de l’OMS	22
2. ANOMALIES GÉNÉTIQUES À VALEUR PRONOSTIQUE DANS LES LEUCÉMIES AIGUËS PÉDIATRIQUES ET TRAITEMENTS	23
2.1. Anomalies génétiques récurrentes dans la leucémie myéloïde aiguë pédiatrique	23
2.1.1. Anomalies cytogénétiques associées à la leucémie myéloïde aiguë pédiatrique	24

2.2.	Anomalies génétiques récurrentes dans la leucémie lymphoblastique aiguë pédiatrique	28
2.2.1.	Leucémie lymphoblastique aiguë de type B	28
2.2.2.	Leucémie lymphoblastique aiguë de type T	30
2.3.	Traitement des leucémies aiguës pédiatriques	31
2.3.1.	Stratégies thérapeutiques	33
2.3.2.	Stratégies de traitement ciblant des réarrangements chromosomiques spécifiques	33
2.3.2.1.	Traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë associée à la présence du chromosome de Philadelphie	33
2.3.2.2.	Traitement de la leucémie myéloïde aiguë associée à la fusion PML-RAR α	34
3.	MÉCANISMES DES RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES ET LEURS CONSÉQUENCES POUR LES CELLULES	35
3.1.	Les mécanismes responsables des translocations et insertions chromosomiques	36
3.2.	Les conséquences moléculaires des translocations et insertions chromosomiques	39
3.2.1.	Dérégulation de l'expression de gènes à structure normale	39
3.2.2.	Formation de gènes de fusion	40
3.2.2.1.	Gènes de tyrosines kinases	40
3.2.2.2.	Gènes de facteurs de transcription	40
4.	L'ORIGINE PRÉNATALE DES LEUCÉMIES PÉDIATRIQUES	41
4.1.	Les évidences de l'origine prénatale des leucémies pédiatriques	41
4.1.1.	Les études de jumeaux monozygotes	42
4.1.2.	Examen rétrospectif de gouttes de sang néonatal	45
4.1.3.	Dépistage moléculaire sur sang de cordon	46
4.2.	Anomalie chromosomique d'origine prénatale : la fusion <i>ETV6-RUNX1</i>	46
5.	OBJECTIFS	49
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES		51
1.	APPROCHE EXPÉRIMENTALE	52
2.	IDENTIFICATION DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES PAR ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE STANDARD	52
2.1.	Obtention du caryotype en bandes GTG	53
2.1.1.	La culture cellulaire	53
2.1.2.	La récolte	53
2.1.2.1.	Traitement à la colcémide	53
2.1.2.2.	Choc hypotonique	54
2.1.2.3.	Fixation	54

2.1.2.4.	Étalement	54
2.1.3.	Marquage des chromosomes	55
3.	ÉTABLISSEMENT D'UN NOUVEAU PANEL POUR L'IDENTIFICATION DES RÉARRANGMENTS GÉNIQUES DANS LES LEUCÉMIES LYMPHOBLASTIQUES AIGUËS ET LES LEUCÉMIES MYÉLOÏDES AIGUËS PÉDIATRIQUES PAR FISH.....	55
3.1.	Technique de FISH	56
3.1.1.	Prétraitement.....	56
3.1.2.	Préparation des sondes et hybridation.....	56
3.1.3.	Lavage et coloration.....	57
3.1.4.	Analyse	57
3.2.	Panels établis.....	58
3.2.1.	Panel des leucémies lymphoblastiques aiguës	58
3.2.2.	Panel des leucémies myéloïdes aiguës.....	61
4.	CARTOGRAPHIE PAR FISH DES NOUVELLES ALTÉRATIONS SÉLECTIONNÉES PAR FISH À L'AIDE DE BACs	63
4.1.	Insertion (X;6).....	63
4.2.	Translocation (12;13).....	65
5.	ÉTUDE DE L'ALTÉRATION D'EXPRESSION DES GÈNES RÉARRANGÉS CHEZ LES PATIENTS 1 ET 2 PAR RT-qPCR.....	66
5.1.	Extraction de l'ARN	66
5.2.	RT-PCR en temps réel	67
5.2.1.	Transcription inverse	67
5.2.2.	Choix des amorces.....	67
5.3.	Amplification par PCR quantitatif en temps réel	68
CHAPITRE III : RÉSULTATS	70	
1.	DÉTECTION D'ANOMALIES CHROMOSOMIQUES PAR CYTOGÉNÉTIQUE STANDARD ET FISH	71
2.	CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU RÉARRANGEMENT AVEC UNE INSERTION (X;6) CHEZ DES JUMELLES AVEC UNE LEUCÉMIE MYÉLOÏDE AIGUË ...	71
2.1.	Présentation clinique	71
2.2.	Panel et cytogénétique standard	72
2.3.	FISH.....	73
2.3.1.	Peinture chromosomique	73
2.3.2.	Localisation des points de cassures impliqués dans l'insertion (X;6) par FISH	74

2.3.2.1.	Localisation du point de cassure Xp11.2	74
2.3.2.2.	Localisation du point de cassure 6q23	77
2.3.2.3.	Localisation du point de cassure 6q21	79
2.4.	RT-qPCR pour l'étude d'expression des gènes <i>MYB</i> , <i>GATA1</i> et <i>HDAC6</i> chez les patients 1 et 2.....	82
3.	CARACTERISATION DE TROIS CAS DE TRANSLOCATION (12 ;13) PAR FISH... 83	
3.1.	Patient 3 portant une translocation (12 ;13).....	83
3.1.1.	Présentation clinique.....	83
3.1.2.	Panel et cytogénétique standard.....	83
3.1.3.	Localisation du point de cassure 13q du patient 3 par FISH.....	84
3.2.	Patient 4 portant une translocation t(12 ;13).....	84
3.2.1.	Présentation clinique.....	84
3.2.2.	Panel et cytogénétique standard.....	85
3.2.3.	Localisation du point de cassure 13q du patient 4 par FISH.....	85
3.3.	Patient 5 portant une translocation (12;13).....	89
3.3.1.	Présentation clinique.....	89
3.3.2.	Panel et cytogénétique standard.....	89
3.3.3.	Localisation du point de cassure 13q du patient 5 par FISH.....	89
	CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSION	91
	BLIOGRAPHIE	117
	ANNEXES.....	xiii
	ANNEXE 1 : LOCALISATION DES DIFFÉRENTES SONDES UTILISÉES DANS LE PANEL DES LEUCÉMIES LYMPHOBLASTIQUES AIGUËS EN FISH.....	xiii
	ANNEXE 2 : LOCALISATION DES DIFFÉRENTES SONDES UTILISÉES DANS LE PANEL DES LEUCÉMIES MYÉLOIDES AIGUËS EN FISH.....	xvii
	CURRICULUM VITAE	xx

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Sondes utilisées en FISH pour mettre en évidence les anomalies chromosomiques fréquentes ainsi que de nouveaux réarrangements dans les leucémies lymphoblastiques aiguës pédiatriques	61
Tableau II: Sondes utilisées en FISH pour mettre en évidence les anomalies chromosomiques fréquentes ainsi que de nouveaux réarrangements dans les leucémies myéloïdes aiguës pédiatriques	62
Tableau III: Sondes utilisées dans la caractérisation des points de cassures de l'insertion (X;6) des patients 1 et 2.	64
Tableau IV: Sondes utilisées pour la caractérisation des points de cassure impliqués dans les cas de translocation (12;13) des patients 3,4 et 5.....	65
Tableau V: Séquences des amorces utilisées dans les réactions de RT-qPCR chez les patients 1 et 2	68
Tableau VI: Données cliniques et hématologiques des patients 1 et 2 au diagnostic.	72
Tableau VII: Pourcentage d'expression des gènes <i>MYB</i> , <i>GATA1</i> et <i>HDAC6</i> par RT-qPCR des patients 1 et 2 par rapport à un contrôle normal.....	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Amélioration de la survie des enfants atteints de leucémie lymphoblastique aiguë entre les années 1960 et 2004.	32
Figure 2: Proportions des gènes impliqués dans des translocations dans le cancer chez l'homme.	36
Figure 3: La réparation des cassures double brins s'effectue par deux voies NHEJ.....	37
Figure 4: Conséquences moléculaires d'un réarrangement équilibré	39
Figure 5: Le partage de la vascularisation du placenta monochorionique	43
Figure 6: La concordance de la leucémie chez des jumeaux monozygotes: la série LRF (1993-2003)	44
Figure 7: Points de cassure clonotypiques de la fusion <i>ETV6-RUNX1</i>	44
Figure 8: Modèle de l'apparition de la leucémie aiguë de l'enfant	45
Figure 9: Les protéines ETV6, RUNX1 et ETV6-RUNX1	48
Figure 10: Modèle d'action de la protéine RUNX1 et la fusion ETV6-RUNX1	49
Figure 11: Caryotypes des patients 1 et 2 présentant la formule chromosomique 46,XX,ins(X;6)(p11.2;q21q23).	72
Figure 12: Peinture des chromosomes 6 et X du patient 1 sur moelle osseuse au diagnostic.....	73
Figure 13: Idéogrammes des chromosomes X et 6	73
Figure 14: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-1137J13, RP11-1037C20 et la sonde LSI MYB	75

Figure 15: Analyse de FISH du patient 1 avec le BAC RP11-1137J13.....	75
Figure 16: Analyse de FISH du patient 1 avec le BAC RP11-416B14.....	76
Figure 17: Localisation du point de cassure Xp11.23	76
Figure 18: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-104D9 et RP11-557H15.	77
Figure 19: Analyse de FISH du patient 1 avec le BAC RP11-141K5.	78
Figure 20: Analyse de FISH du patient 1 avec le BAC RP11-323N12	78
Figure 21: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-249L21 et RP11-506B6	79
Figure 22: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-428F8 et RP11-506B6 ..	79
Figure 23: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-622I4 et RP11-341J6	80
Figure 24: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-75C8 et RP11-28L24	80
Figure 25: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-28L24 et RP11-598H4..	81
Figure 26: Caryotype et FISH du patient 3 présentant la formule chromosomique 46,XX,t(12 ;13)(p13 ;q ?12).....	83
Figure 27: Analyse de FISH du patient 3 avec le BAC RP11-136G6	84
Figure 28: Caryotype et FISH du patient 4 présentant la formule chromosomique 46,XY,del(2)(q31),t(12 ;13)(p13 ;q ?12).....	85
Figure 29: Analyse de FISH du patient 4 avec le BAC RP11-136G6	86
Figure 30: Analyse de FISH du patient 4 avec la sonde LSI FKHR dual color breakapart	86
Figure 31: Analyse de FISH du patient 4 avec la sonde LSI 13(RB1)	87

Figure 32: Analyse de FISH du patient 4 avec la sonde LSI D13S25	87
Figure 33: Analyse de FISH du patient 4 avec la sonde Poseidon DLEU/13qter.....	88
Figure 34: Figure résumant la localisation du point de cassure 13q14 du patient 4	88
Figure 35: Caryotype et FISH du patient 5 présentant la formule chromosomique 46,XX,t(12 ;13)(p13 ;q ?14).....	89
Figure 36: Analyse de FISH du patient 5 avec la sonde LSI FKHR breakapart.....	90
Figure 37: Différents dérivés X possibles suite à l'insertion (X ;6).....	94
Figure 38: Structure du gène <i>GATA1</i>	96
Figure 39: Les 2 isoformes GATA1 et GATA1s du gène <i>GATA1</i>	98
Figure 40: Structure du gène <i>MYB</i>	98
Figure 41: Structure du gène <i>HDAC6</i>	100
Figure 42: Structure des protéines CCN.....	102
Figure 43: Structure du gène <i>ETV6</i>	105
Figure 44: Hétérogénéité des partenaires de fusion d' <i>ETV6</i>	105
Figure 45: Conséquences de la fusion d' <i>ETV6</i> à un gène de tyrosine kinase	106
Figure 46: Exemples de fusions d' <i>ETV6</i>	107
Figure 47: Fusion de <i>FOXO1</i> à <i>PAX3</i> et <i>PAX7</i> suite aux translocations t(2;13) et t(1;13) respectivement.....	113
Figure 48: Régions chromosomiques couvertes par la sonde LSI FKHR dual color breakapart	114

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- ATRA:** *All-trans retinoic acid*/ Acide tout-trans-rétinoïque
- BrdU:** 5-bromo-2-déoxyuridine
- BAC:** *Bacterial Artificial Chromosome*
- CLP:** *Common lymphoid progenitor*
- CMP:** *Common myeloid progenitor*
- CSL:** cellule souche leucémique
- CSHP:** cellule souche hématopoïétique pluripotente
- DAPI:** 4',6'-diamidino-2-phenylindole
- del:** délétion
- EPO:** Érythropoïétine
- FAB:** *French-American-British*
- FISH:** *Fluorescence in situ hybridization*/ Hybridation *in situ* en fluorescence
- FT:** Facteur de transcription
- GM-CSF:** *Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*
- HDAC:** Histone désacétylase
- HSR:** *Homogeneous staining region*
- IG:** Immunoglobulines
- IL:** Interleukine
- inv:** Inversion
- ITD :** *Internal tandem duplication*
- kb:** Kilobases
- KCL:** Chlorure de potassium
- LBA:** Leucémie basophile aiguë
- LLA:** Leucémie lymphoblastique aiguë
- LLA-B:** Leucémie lymphoblastique aiguë de type B
- LLA-T:** Leucémie lymphoblastique aiguë de type T
- LLC:** Leucémie lymphoblastique chronique
- LMA:** Leucémie myéloïde aiguë

LMKA: Leucémie mégakaryoblastique aiguë
LMC: Leucémie myéloïde chronique
LPA: Leucémie promyélocytaire aiguë
LRF: *Leukemia Research Fund*
M-CSF: *Myeloid colony stimulating factor*
Mb: Mégabase
ml: millilitre
NHEJ: *Non-homologous end joining*
NK: *Natural killer*
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
pb: paire de bases
PCL: Progéniteur commun de cellules lymphoïdes
PCM: Progéniteur commun de cellules myéloïdes
PCR: *Polymerase chain reaction* / Réaction en chaîne par polymérase
PTD : *partial tandem duplication*
RT-PCR: *Real time-polymerase chain reaction*/ Réaction en chaîne par polymérase en temps réel
RT-qPCR: *Real time-quantitative polymerase chain reaction*
SEER : *Surveillance, Epidemiology and End Results*
SMD: Syndrome myélodysplasique
SMT: Syndrome myéloprolifératif transitoire
SNC: Système nerveux central
SSA: *single-strand annealing*
SSC: *saline-sodium citrate*
t: translocation
TCR: *T cell receptor*/ récepteur de cellules T

REMERCIEMENTS

Je remercie d'abord mon directeur, le Dr Raouf Fetni, pour son appui et soutien tout au long de ma maîtrise, ainsi que sa confiance en moi.

Je tiens également à remercier toute l'équipe technique du laboratoire de cytogénétique postnatale de l'Hôpital Ste Justine pour avoir rendu mon parcours durant la maîtrise un des plus agréables.

Je tiens à remercier particulièrement Dr Dorothée Bouron-Dal Soglio, sans l'appui de laquelle le parcours aurait été difficile. Je la remercie pour ses conseils, sa motivation et son efficacité. Nos collaborations à plusieurs occasions ont été très éducatives.

Je tiens à remercier aussi Dr Josiane Larose pour sa collaboration très appréciée à la réalisation de ce projet. Je remercie de même Madame Fléchère Fortin, toujours prête à partager ses amples connaissances.

Mon plus grand merci s'adresse à ma famille pour leur soutien permanent et inconditionnel. Je vous remercie pour votre confiance et votre présence pendant les moments de découragement comme les moments de motivation. Maman, mes sœurs Racha et Dona Maria, mon cœur Karim et notre enfant qui m'a accompagné pendant la rédaction et qui viendra au monde dans les prochains jours, c'est à vous cinq que je dédicace mon mémoire.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. LEUCÉMIE AIGUË

La leucémie, du grec *leukos*, (blanc) et *haima* (sang), se définit comme une malignité caractérisée par une accumulation incontrôlée de cellules immatures, non différenciées de la moelle osseuse, les blastes. La prolifération clonale de blastes de la lignée myéloïde peut être chronique ou aiguë, définissant ainsi la leucémie myéloïde chronique (LMC) ou la leucémie myéloïde aiguë (LMA) respectivement. Au niveau de la lignée lymphoïde, la prolifération des blastes peut être chronique, définissant la leucémie lymphoblastique chronique (LLC), ou aiguë dans la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA). Dans la leucémie aiguë, les blastes, cellules non fonctionnelles, ne se différencient pas normalement mais se multiplient rapidement et remplacent les cellules normales. La leucémie chronique implique souvent des cellules plus différenciées.

Chez l'enfant (entre 0 et 14 ans), la leucémie est le cancer le plus fréquent, représentant approximativement un tiers des cancers diagnostiqués chez cette population (Parkin, Stiller et al. 1988). Selon les Statistiques Canadiennes du Cancer publiées en 2009, 32% des cas de cancers pédiatriques diagnostiqués entre 2001 et 2005 étaient des leucémies. Parmi les 1345 cas diagnostiqués durant cette période, 80% était des leucémies lymphoblastiques et 20% des leucémies myéloïdes. En effet, il existe une grande hétérogénéité dans les leucémies pédiatriques, les LLAs et les LMAs étant les formes les plus fréquentes. Les formes chroniques de la leucémie sont très rares dans la population pédiatrique. La survie après 5 ans est de 67% chez les patients atteints d'une LMA, inférieure à celle des patients avec une LLA, qui est de 91% (www.cancer.ca). À la différence des autres cancers, la leucémie pédiatrique est caractérisée par une augmentation de l'incidence après la naissance et un pic d'incidence entre les âges de 2 et 5 ans (Linnet and Devesa 1991).

1.1. Hématopoïèse normale

L'hématopoïèse est un processus de plusieurs étapes régulées menant à la production de différents types de cellules sanguines dans la moelle osseuse. La continuité de ce processus

est assurée par les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (CSHP). En effet, ce sont des cellules capables d'autorenouvellement et de différenciation en cellules de toutes les lignées hématopoïétiques. Ces caractéristiques leurs sont conférées par une régulation intrinsèque par des facteurs de transcription (FT), tels que les gènes *Hox* et *SCL*, des inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes, et une régulation extrinsèque par des voies de signalisation telles que les voies Notch et Wnt (Cheung, Kwong et al. 2006). La télomérase, une transcriptase inverse, est aussi importante dans le maintien de la capacité d'autorenouvellement en permettant de maintenir la longueur des télomères au cours des divisions cellulaires (Fey 2007).

En se divisant, la CSHP conduit à la formation de progéniteurs communs de cellules lymphoïdes (PCLs) et de progéniteurs communs de cellules myéloïdes (PCMs). La différenciation et maturation des PCLs conduit à la production des différents types de cellules lymphoïdes, à savoir les lymphocytes B et T et les *natural killers* (NK), et des granulocytes/monocytes, les plaquettes et les érythrocytes dans le cas des PCMs (Fey 2007).

Durant la vie prénatale, l'hématopoïèse commence à trois semaines de gestation. Cette hématopoïèse, appelée « primitive », entraîne la production d'érythrocytes dans le sac vitellin afin de permettre un apport adéquat en oxygène aux tissus en développement. Après les deux premiers mois de gestation, le foie devient le site primaire de l'hématopoïèse, appelée « définitive ». Les leucocytes, les plaquettes et les érythrocytes sont alors générés. Par la suite, le processus migre du foie vers le thymus et la rate pour enfin arriver à la moelle osseuse vers les cinquième et sixième mois de gestation (Orkin and Zon 2008).

L'hématopoïèse est régulée par un grand nombre de cytokines et par le micro-environnement médullaire, c'est-à-dire la matrice extracellulaire et les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales et adipocytes). Des cytokines telles que l'IL-1 (interleukin-1), l'IL-3 (interleukin-3), l'IL-6 (interleukin-6), l'IL-11 (interleukin-11)

agissent sur la CSHP durant les premières étapes de l'hématopoïèse. D'autres sont plus lignées-spécifiques tels que l'IL-5, l'EPO (érythropoïétine), le M-CSF (*myeloid-colony stimulating factor*) et le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Hoffbrand and Pettit 1993).

Un autre niveau de régulation est assuré par les FTs. Ce niveau de régulation regroupe des protéines de liaison à l'ADN dont un grand nombre est impliqué dans des translocations chromosomiques ou des mutations somatiques dans les hémopathies malignes. Alors que certains de ces FTs sont importants dans la formation et le fonctionnement de la CSHP, d'autres sont primordiaux dans la différenciation lignée-spécifique. Parmi les gènes importants pour la formation et le fonctionnement de la CSHP, on retrouve les gènes *MLL* (*Mixed-Lineage Leukemia*), *RUNX1* (*runt-related transcription factor 1*), *ETV6* (*ets variant gene 6*), et *LMO2* (Orkin and Zon 2008). D'autre part, des gènes tels que *C/EBP α* ou *GATA1* sont importants dans la différenciation. Les facteurs lignée-spécifiques favorisent la différenciation en une lignée spécifique tout en réprimant des facteurs spécifiques à d'autres lignées. Un exemple de telles protéines antagonistes est *GATA1* et *PU.1* qui favorisent la différenciation des érythrocytes/mégacaryocytes et des éléments de la lignée myéloïde respectivement (Galloway, Wingert et al. 2005; Rhodes, Hagen et al. 2005)

Dans le cadre de l'hématopoïèse définitive, les CSHPs du foie fœtal sont différentes de celles de la moelle osseuse, de par leurs marqueurs de surface et leur potentiel de développement. Par conséquent, certains facteurs agissent de manière spécifique à l'âge de la CSHP. Par exemple, le facteur *Sox17* serait central à la génération de la CSHP adulte mais pas du foie fœtal (Kim and Bresnick 2007). De plus la CSHP adulte est caractérisée par une augmentation de l'expression de gènes associés à la leucémie, une diminution de l'expression de gènes réparateurs de l'ADN et un biais de différenciation vers la lignée myéloïde (Sudo, Ema et al. 2000; Rossi, Bryder et al. 2005; Nijnik, Woodbine et al. 2007).

1.2. Leucémogénèse

La leucémie est un ensemble de processus hématopoïétiques aberrants prenant origine dans des cellules souches leucémiques (CSL) rares ayant accumulé des mutations et/ou des changements épigénétiques. Ces altérations permettent à la cellule de maintenir ou de réacquérir la capacité d'autorenouvellement et de prolifération clonale indéfinie (Passegue and Weisman 2005). L'existence de CSLs a été mise en évidence dans les années 90, quand des études de transfection de cellules primaires de LMA dans des souris SCID ont montré que seule une sous-population rare de cellules, marquées CD34+CD38-, était capable d'initier et maintenir la prolifération du clone leucémique (Lapidot, Sirard et al. 1994). Des expériences de transfection en série de ces cellules rares ont montré qu'elles avaient un haut potentiel d'autorenouvellement (Bonnet and Dick 1997). Ainsi, comme les CSHPs normales, les CSLs sont capables d'initier la leucémie et de conduire à la différenciation d'une panoplie de cellules à fonction différentes.

L'origine de la CSL est discutée dans la littérature. Une première hypothèse propose que la CSL soit une CSHP ayant accumulé des mutations lui conférant un caractère leucémique. En effet, les CSHPs possèdent déjà le caractère d'autorenouvellement, et ont une durée de vie qui permet l'accumulation de mutations. Dans ce sens, il a été démontré que dans tous les types de LMA hormis la leucémie promyélocytaire aiguë (LAP ou LMA-M3), seules les cellules CD34+CD38- ont la capacité d'initier la leucémie dans les souris NOD/SCID. Des blastes plus différenciés n'ont pas cette capacité (Lapidot, Sirard et al. 1994; Bonnet and Dick 1997). Une deuxième hypothèse postule que la CSL dériverait de progéniteurs engagés ou même différenciés : elle accumulerait des mutations suite à la réacquisition de la capacité d'autorenouvellement. Des évidences en faveur de cette hypothèse proviennent d'expériences de transfection dans lesquelles des gènes de fusion leucémiques, tels la fusion *MLL-ENL* de la translocation t(11;19)(q23;p13.3), provoqueraient la leucémie dans les CSHPs comme dans les PCMs (Cantor and Orkin 2001). Certains oncogènes auraient donc la capacité de conférer à la cellule mature un potentiel d'autorenouvellement.

Comme pour la majorité des cancers, la leucémogénèse impliquerait une interaction entre les gènes et l'environnement. Les expositions à des substances toxiques ou carcinogènes durant la grossesse (exposition directe à des radiations ionisantes ou indirectes par le biais de l'ingestion maternelle) chez la femelle pourraient causer des dommages à l'ADN. Même si plusieurs facteurs, tels que certaines infections, la consommation de drogues et la déficience en folate, sont proposés comme carcinogènes *in utero*, il n'existe pas d'évidences concluantes au lien entre l'exposition pré-gestationnelle et le cancer (Lightfoot and Roman 2004). Seules les expositions fœtales aux radiations ionisantes (Stewart, Webb et al. 1958) et au diethylstilbestrol (Herbst, Ulfelder et al. 1971) ont été prouvées carcinogènes. Par ailleurs, suite à l'exposition à des inhibiteurs de topoisomérase II dans un cadre thérapeutique, les réarrangements de *MLL* sont les réarrangements les plus fréquents des leucémies secondaires (Felix, Kolaris et al. 2006).

1.3. Classification des leucémies aiguës

La classification FAB (*French-American-British*), publiée en 1976, se base sur des données morphologiques, immunophénotypiques, cytochimiques et cliniques pour classer les leucémies aiguës.

L'autre classification, plus récente et plus utilisée, est la classification de L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) dont la dernière édition «WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2008 » est apparue en 2008. Celle-ci a intégré, pour la première fois en 2001, les facteurs génétiques aux autres facteurs (facteurs morphologiques, immunophénotypiques, cytochimiques et cliniques) dans la classification.

1.3.1. La leucémie lymphoblastique aiguë

1.3.1.1. La classification FAB

La classification FAB divise les LLAs en 3 groupes :

L1 : petites cellules uniformes

L2 : grosses cellules variées

L3 : grosses cellules variées avec vacuoles

L'immunophénotypage permet en deuxième lieu de déterminer le type de marqueurs de surface des blastes, c'est-à-dire s'il s'agit de cellules lymphocytaires B ou T. La leucémie lymphoblastique aiguë de type B, ou LLA-B, est la prolifération non régulée de cellules progénitrices engagées dans la lignée lymphocytaire B. La leucémie lymphoblastique aiguë de type T, ou LLA-T, est la prolifération non régulée de cellules progénitrices engagées dans la lignée lymphocytaire T.

1.3.1.2. La classification de l'OMS

La classification de l'OMS a introduit les anomalies génétiques dans la classification car il s'agit de facteurs pronostiques importants.

1.3.1.2.1. Leucémie lymphoblastique aiguë de type B

Selon la classification de l'OMS de 2008, les LLA-B sont divisées en 2 groupes :

- Les LLAs-B associées à des anomalies génétiques récurrentes.
- Les LLAs-B non associées à des anomalies génétiques récurrentes.

Dans le premier groupe, on retrouve les anomalies suivantes :

- t(9;22)(q34;q11.2) conduisant à la formation du gène de fusion *BCR-ABL1*
- les translocations impliquant un réarrangement de *MLL* (11q23) : principalement la t(4;11)(q21;q23) et la t(11;19)(q23;p13.3)
- t(12;21)(p13;q22) conduisant à la fusion *ETV6-RUNX1*
- l'hyperploïdie, soit un nombre de chromosomes compris entre 51-57
- l'hypoploïdie, soit un nombre de chromosomes inférieur à 45
- t(5;14)(q31;q32) *IL3-IGH* conduisant à la surexpression d'*IL3*
- t(1;19)(q23;p13.3) entraînant la fusion *TCF3-PBX1*

Le deuxième groupe regroupe les LLAs-B non associées à des anomalies génétiques récurrentes. Les critères de classification non génétiques seraient alors utiles pour identifier l'appartenance des blastes à la lignée lymphocytaire B.

1.3.1.2.2. Leucémie lymphoblastique aiguë de type T

Selon la classification de l'OMS de 2008, les LLAs-T ne sont pas divisées selon les facteurs génétiques car ceux-ci ne sont pas clairement associés à des caractéristiques biologiques uniques des LLAs-T. L'immunophénotype identifie et classe alors les blastes dans la lignée lymphocytaire T.

- Les anomalies les plus récurrentes dans ce groupe sont les translocations impliquant les locus α et δ des récepteurs des cellules T (TCR) en 14q11.2, le locus β en 7q35 et le locus γ en 7p14-15 avec une liste étendue de partenaires. Ces translocations entraînent la surexpression des gènes partenaires, majoritairement des facteurs de transcription.

Cependant, dans les dernières années, la survie à 5 ans des patients atteints de LLA-T s'est considérablement améliorée grâce, en partie, à la mise en évidence d'anomalies chromosomiques impliquant des gènes de tyrosines kinases. Ces patients sont aujourd'hui traités avec des inhibiteurs de tyrosine kinases (Cools 2010).

1.3.2. La leucémie myéloïde aiguë

1.3.2.1. La classification FAB

Dans la classification FAB, les LMAs sont divisées en 8 groupes, allant de M0 à M7, dépendamment du type de cellules affectées et de leur stade de maturation (Bennett, Catovsky et al. 1976).

M0 : LMA avec différenciation minimale

M1 : LMA sans maturation

M2 : LMA avec maturation glanulocytaire

M3 : leucémie promyélocytaire aiguë

M4 : leucémie myéломocytaire aiguë

M4eo : leucémie myéломocytaire aiguë avec éosinophilie

M5 : leucémie érythroïde aiguë

M6 : leucémie mégacaryoblastique aiguë

M7 : leucémie basophile aiguë

1.3.2.2. La classification de l'OMS

Cette classification divise les LMAs en 4 groupes.

Le premier groupe regroupe les LMAs avec anomalies génétiques récurrentes, à savoir les réarrangements chromosomiques et les mutations géniques. On y distingue :

- La t(8;21)(q22;q22) associée au gène de fusion *RUNX1-RUNX1T1*
- L'inv(16)(p13.1q22) ou la t(16;16)(p13.1;q22) formant la fusion *CBFβ-MYH11*
- La t(15;17)(q24;q21) donnant la fusion *PML-RARα*
- Les réarrangements de *MLL*
- les mutations *NPM1* ou *CEBPA* qui ont été classées comme deux entités provisoires.

Les mutations de *FLT3* ne sont pas classées dans une catégorie distincte car elles accompagnent en général d'autres anomalies comme la t(15;17)(q22;q12) et la t(6;9)(p23;q34). Elles demeurent cependant de valeur pronostique importante.

Le deuxième groupe englobe les LMAs avec changements myélodysplasiques présentant une des caractéristiques suivantes :

- Présence d'une histoire de syndrome myélodysplasique (SMD) ayant évolué vers une LMA.
- Présence d'anomalies cytogénétiques des SMDs.
- Présence d'une myélodysplasie multilignée : au moins 50% des cellules appartenant à au moins 2 lignées myéloïdes sont dysplasiques.

Le troisième groupe des LMAs sont les LMAs secondaires, survenues suite à des traitements chimiothérapeutiques ou d'une radiothérapie.

Toutes les LMAs non-classifiables dans les 3 premiers groupes sont regroupées dans le quatrième groupe. Les critères morphologiques et immunophénotypiques sont notés afin de d'identifier l'appartenance à la lignée myéloïde et le stade de maturation.

2. ANOMALIES GÉNÉTIQUES À VALEUR PRONOSTIQUE DANS LES LEUCÉMIES AIGÜES PÉDIATRIQUES ET TRAITEMENTS

Dans le but de classer les patients en groupes de risque, plusieurs facteurs pronostiques sont utilisés dans le cadre clinique chez les patients leucémiques. Ainsi, l'âge, le nombre de leucocytes au diagnostic, l'immunophénotype, les anomalies chromosomiques et la réponse au traitement initial (évaluée par la mesure de la maladie résiduelle, c'est-à-dire les blastes persistants durant ou après traitement, par cytométrie de flux et/ou par réaction en chaîne par polymérase ou PCR) sont pris en considération lors du diagnostic et du choix de thérapie. Ils permettent de stratifier les patients en groupes de risque afin d'administrer des traitements intensifs au groupe à haut risque et de diminuer les doses chez les patients à faible risque pour éviter les effets secondaires et la toxicité. L'analyse génétique demeure un des facteurs pronostiques les plus importants dans la leucémie aiguë pédiatrique.

2.1. Anomalies génétiques récurrentes dans la leucémie myéloïde aiguë pédiatrique

La LMA pédiatrique est une malignité hétérogène au niveau clinique et génétique. Elle représente 15-20% des leucémies aiguës pédiatriques et est à l'origine de plus de la moitié de la mortalité due aux leucémies chez ces patients. Des facteurs pronostiques ont été établis afin de classer les patients en groupes de risque et les traiter de façon appropriée pour optimiser les traitements tout en limitant les effets secondaires et la toxicité. L'analyse cytogénétique demeure l'un des déterminants pronostiques les plus importants dans les LMAs pédiatriques. En effet, cette analyse permet de mettre en évidence des anomalies chromosomiques clonales chez 70 à 85% des enfants avec une LMA. Il est

accepté que la LMA soit issue de la coopération de mutations parmi 2 groupes d'altérations génétiques :

- la classe I de mutations est caractérisée par l'activation constitutive de signaux de transduction tels que les mutations de *RAS*, *KIT* ou *FLT3* menant à des signaux prolifératifs et antiapoptotiques (Scholl, Gilliland et al. 2008).
- la classe II de mutations regroupe les translocations chromosomiques et entraîne une dérégulation de différenciation et d'autorenouveauement des précurseurs hématopoïétiques (Scholl, Gilliland et al. 2008).

2.1.1. Anomalies cytogénétiques associées à la leucémie myéloïde aiguë pédiatrique

Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes ont été mises en évidence et caractérisées et sont utilisées pour le diagnostic, le pronostic et le suivi par mesure de la maladie résiduelle.

➤ LMA à caryotype normal

Les LMAs à caryotype normal sont classées dans le groupe de risque intermédiaire. Une proportion importante des patients dont le caryotype est rapporté normal présentent souvent des réarrangements moléculaires tels que :

- La duplication intragénique en tandem de la tyrosine kinase *FLT3* ou *FLT3-ITD* (*internal tandem repeat*). Retrouvée dans 20-25% des LMAs à caryotype normal, elle est associée à un mauvais pronostic (Shimada, Taki et al. 2008).
- La duplication partielle en tandem du gène *MLL* ou *MLL-PTD* (*partial tandem duplication*), associée à un très mauvais pronostic (Shimada, Taki et al. 2008).
- Des mutations de *NPM1* (*nucleophosmin*, une protéine circulant entre le nucléole et le cytoplasme et qui serait importante dans la régulation de la voie ARF/p53). Ces mutations sont retrouvées dans 20-30% des cas de LMAs pédiatriques à caryotype normal et sont associées à un pronostic favorable (Brown, McIntyre et al. 2007; Shimada, Taki et al. 2008).

- Des mutations de *CEBPA* (*CCAAT/enhancer binding protein-alpha*, un facteur de transcription régulant la prolifération et différenciation granulocytaire). Ces mutations sont associées à un pronostic favorable et représentent 17% des LMAs à caryotype normal (Ho, Alonzo et al. 2009).

➤ -5/del(5q)

La monosomie 5 et la délétion 5q sont des anomalies rares, représentant 0-2.5% des LMAs pédiatriques. Elles sont associées à un mauvais pronostic (Meshinchi and Arceci 2007). L'incidence de ces aberrations est plus élevée chez les patients ayant une LMA secondaire à un traitement chimiothérapique avec des agents alkylants.

➤ -7/del(7q)

Ces aberrations du chromosome 7 sont observées dans 2-7% des LMAs pédiatriques. Une étude récente effectuée sur 258 patients avec LMA pédiatrique et -7/del(7q) a démontré que la délétion 7q accompagnant des anomalies de bon pronostic dans les LMA, telle que la t(8;21)(q22;q22), a un meilleur pronostic et une survie après 5 ans de 75% que quand elle a lieu sans les anomalies de bon pronostic (survie après 5 ans de 46%). La monosomie 7, de mauvais pronostic, est plus fréquente dans les cas de LMAs secondaires à la radiothérapie aux agents alkylants (Hasle, Alonzo et al. 2007). C'est l'anomalie acquise la plus fréquente chez les enfants atteints du syndrome de Fanconi, syndrome prédisposant à la LMA (Owen, Barnett et al. 2008).

➤ Réarrangements d'*ETV6* (12p13)

Les réarrangements chromosomiques d'*ETV6* sont moins fréquents dans les LMAs que dans les LLAs. Cependant, il existe certaines translocations retrouvées dans ce type de leucémie, telles que la translocation t(7;12)(q36;p13).

- t(7;12)(q36;p13)

Il s'agit d'une translocation rare impliquant la fusion d'*ETV6* en 12p13 à *HLXB9* en 7q36. Elle est cryptique dans la majorité des cas où elle n'est détectable que par hybridation *in*

situ en fluorescence (FISH). Elle est majoritairement associée à la LMA du nourrisson, représentant 30% des anomalies des LMAs chez cette population. Dans la population pédiatrique, elle représente 3% des cas de LMA. Elle est associée à un mauvais pronostic avec une survie à 3 ans de 0% (von Bergh, van Drunen et al. 2006).

➤ Trisomie 8

La trisomie 8 est retrouvée dans 5-10% des LMAs pédiatriques et dans 27% des LMAs chez les patients atteints du syndrome de Down. Sa valeur pronostique est discutée. Cependant une étude récente a montré que la trisomie 8 était de mauvais pronostic, qu'elle soit primaire ou secondaire (Betts, Ammann et al. 2007).

➤ t(8;21)(q22;q22)

La translocation (8;21) représente une des anomalies les plus fréquentes dans les LMAs pédiatriques : elle est présente dans 7-16% des LMAs pédiatriques et dans 40% des LMAs-M2. Elle met en jeu la fusion du gène *RUNXI* en 21q22 au gène *RUNXITI* en 8q22. Elle confère un bon pronostic. La délétion 9q accompagne cette translocation dans certains cas et serait de mauvais pronostic comme une étude le suggère (Schoch, Haase et al. 1996). La présence d'anomalies caryotypiques additionnelles (dans le cadre d'un caryotype complexe) n'aurait pas d'effets sur le pronostic (Meshinchi and Arceci 2007). Cependant, des mutations du gène *KIT* en 4q11 confèrent un mauvais pronostic aux cas de t(8;21) (Shimada, Taki et al. 2006).

➤ Réarrangements de *MLL* (11q23)

Les translocations impliquant le gène *MLL* sont les anomalies les plus fréquentes dans les LMAs pédiatriques, représentant 14-22% des cas, le plus souvent dans des LMAs-M4 et M5. Les réarrangements de ce gène sont les plus fréquents dans les LMAs du nourrisson (40-65% des cas) (Betts, Ammann et al. 2007). *MLL* a été impliqué dans plus de 51 translocations, dont la t(9;11)(p21;q23) (Hall 2001).

▪ t(9;11)(p22;q23)

C'est la translocation impliquant la bande 11q23 la plus fréquente dans les LMAs pédiatriques. Le gène *AF9* en 9p22 est le partenaire de fusion de *MLL*. Elle est associée à une LMA-M5. Comme anomalie unique, elle a un bon pronostic, surtout quand le nombre de leucocytes au diagnostic est bas. Des anomalies additionnelles seraient des facteurs pronostiques défavorables (Rubnitz, Raimondi et al. 2002).

Les réarrangements de *MLL* sont aussi fréquents suite à des traitements par inhibiteurs de topoisomérase II (Chowdhury and Brady 2008). Comme il a déjà été mentionné, la duplication partielle en tandem de *MLL* confère un très mauvais pronostic (Shimada, Taki et al. 2008).

➤ t(15;17)(q22;q21)

Caractéristique de la LMA-M3, la t(15;17) représente 2-10% des cas de LMA pédiatrique. Elle mène à la fusion de *RARα* en 17q21 à *PML* en 15q22, ce qui entraîne un arrêt de maturation à la phase promyélocytaire.

➤ inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)

Ces anomalies sont le plus souvent associées avec la leucémie myélomonocytaire aiguë avec éosinophilie (LMA-M4eo) (Chan, Wong et al. 2004). Elles sont présentes dans 3-8% des LMAs de l'enfant et confèrent un bon pronostic. Elles sont associées à la fusion de *CBFβ* (*core binding factor β*) en 16q22 à *MYH11* (*muscle myosin heavy chain*) en 16p13. Étant souvent cryptiques, ces réarrangements pourraient être manqués par analyse caryotypique conventionnelle. Pour cela, l'emploi de la FISH est nécessaire. La présence d'une trisomie 22 seule est un indicateur important d'une inversion 16 (Xu, Zhou et al. 2008).

➤ Trisomie 21 acquise

Elle se présente comme anomalie unique dans 1.5-4.6% des cas mais accompagne souvent d'autres anomalies récurrentes comme la t(8;21). Associée à un pronostic intermédiaire,

elle est présente dans 23-43% des patients ayant une leucémie mégakaryoblastique aiguë (LMKA) sans syndrome de Down (Hama, Yagasaki et al. 2008).

➤ Caryotype complexe

Un caryotype complexe comporte 3 anomalies chromosomiques ou plus et est associé à un mauvais pronostic (Betts, Ammann et al. 2007).

2.2. Anomalies génétiques récurrentes dans la leucémie lymphoblastique aiguë pédiatrique

Plusieurs anomalies chromosomiques récurrentes ont été associées à des valeurs pronostiques importantes dans la LLA de l'enfant. Parmi ces anomalies, certaines sont de bon pronostic alors que d'autres semblent être de mauvais pronostic. Les LLAs de type B et T sont caractérisées par des aneuploïdies et translocations chromosomiques récurrentes, dont la détection est primordiale dans le diagnostic et la détermination du groupe de risque du patient.

2.2.1. Leucémie lymphoblastique aiguë de type B

Les cas de LLA-B représentent 80-85 % des LLAs pédiatriques.

Dans ce type de LLA, on retrouve :

➤ La haute hyperdiploïdie

La haute hyperdiploïdie caractérise les caryotypes à 51-65 chromosomes ou un index d'ADN supérieur ou égal à 1.16. Elle représente 25-30% des LLAs pédiatriques et confère un pronostic favorable. Elle est plus fréquente chez les jeunes enfants présentant un nombre faible de leucocytes. La présence de certaines trisomies telles que les trisomies 4,10 et 17 serait associée à un meilleur pronostic (Sutcliffe, Shuster et al. 2005).

➤ t(12;21)(p12;q22)

la translocation (12;21) est le réarrangement chromosomique le plus fréquent dans les LLA, représentant approximativement 20% des cas. Elle entraîne la fusion du gène *ETV6* en 12p12 au gène *RUNX1* en 21q22. Il en résulte une protéine chimerique dont la fonction est de réprimer l'expression des gènes cibles de *RUNX1*. Elle est associée à un nombre faible de leucocytes lors du diagnostic (Harrison, Moorman et al. 2005). La présence de cette translocation indique un pronostic favorable. Étant cryptique, elle est généralement non détectable par analyse caryotypique seule.

➤ t(9;22)(q34;q11)

Ce réarrangement est présent dans 3-5% des LLAs pédiatriques. Il entraîne la fusion du gène *BCR* en 9q22 au gène *ABL1* en 22q11. Même s'il est associé à un mauvais pronostic (taux survie après 5 ans sans événement de 28%), la transplantation de moelle osseuse de donneur apparenté compatible en première remission a permis d'améliorer les taux de survie (Arico, Valsecchi et al. 2000).

➤ Hypodiploïdie sévère/haploïdie

L'hypodiploïdie sévère/haploïdie est observée dans 3-4% des cas de LLAs pédiatriques et confère un mauvais pronostic, la survie sans événement après 8 ans étant estimée à 39% (Harrison, Moorman et al. 2004). Le pronostic le plus défavorable serait associé aux caryotypes presque haploïdes, dont le nombre de chromosomes varie entre 23 et 28 (Nachman, Heerema et al. 2007).

➤ Amplification intrachromosomique de *RUNX1*

L'amplification (c'est-à-dire la présence de 5 copies ou plus) du gène *RUNX1* sur le chromosome 21 est retrouvée dans 1-2% des LLAs de l'enfant où elle est associée à un pronostic plutôt défavorable avec un taux de survie à 5 ans sans événement de 29%. Elle est plus fréquente chez les enfants âgés et les adolescents (moyenne d'âge d'apparition de 9.4 ans) (Moorman, Richards et al. 2007).

➤ Réarrangements de *MLL* (11q23)

Les réarrangements du gène *MLL* en 11q23 sont retrouvés dans 5-8% des LLAs pédiatriques. Ils sont particulièrement fréquents chez le nourrisson (moins de 12 mois), représentant 80% des cas de LLAs diagnostiqués chez cette catégorie d'âge (Behm, Raimondi et al. 1996; Pui, Gaynon et al. 2002) où ils confèrent un pronostic très défavorable (survie à long terme sans événement de 10-30%), indépendamment du gène partenaire de fusion (Pieters, Schrappe et al. 2007). Chez les enfants de plus de 12 mois, le pronostic reste défavorable mais peut varier selon le gène partenaire de fusion. Ainsi, la translocation t(4;11)(q21;q23), impliquant la fusion *MLL-AF4* est associée au pronostic le plus défavorable parmi les réarrangements de *MLL* alors que la fusion *MLL-ENL* de la translocation t(11;19)(q23;p13.3) semble avoir un meilleur pronostic (Pui, Gaynon et al. 2002).

➤ t(1;19)(q23;p13)

la t(1;19) implique la fusion du gène *E2A* en 19p13 au gène *PBX1* en 1q23. Initialement associée à un pronostic défavorable, cette translocation est de moins en moins utilisée comme facteur pronostic à cause de l'intensification des traitements actuels (Raimondi, Behm et al. 1990).

2.2.2. Leucémie lymphoblastique aiguë de type T

Les LLAs de type T représentent 10-15% des LLAs pédiatriques. Avant l'introduction de thérapies intensives, ce groupe était considéré à haut risque. Cependant, les régimes thérapeutiques intensifs ont permis d'atteindre des taux de survie sans événement à 5 ans similaires à ceux des LLAs-B chez l'enfant (Goldberg, Silverman et al. 2003). Dans ce type de LLA, 70% des cas montrent une anomalie chromosomique au caryotype, alors que le reste des cas ont des caryotypes normaux (Harrison 2009). Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes impliquent les locus des TCRs. Elles juxtaposent une région promotrice des gènes *TCRs* à des FTs dont l'expression est altérée. En effet, les aberrations impliquant

TCRA/D et *TCRB* en 14q11 et 7q34 respectivement sont détectées dans 35% des LLAs-T (Cauwelier, Dastugue et al. 2006). À titre d'exemple :

- la translocation cryptique t(5;14)(q35;q32), présente dans 20% des LLAs-T pédiatriques, entraîne la surexpression du gène facteur de transcription *TLX3* (*HOX11L2*).
- La translocation t(10;14)(q24;q11) entraîne la surexpression du gène *TLX1* (*HOX11*).

Cependant, la valeur pronostique de ces réarrangements n'est pas toujours claire.

La FISH et la biologie moléculaire ont été de grande utilité dans la mise en évidence d'anomalies génétiques de valeur pronostique significative :

- Mutations du gène *NOTCH1*

NOTCH1 code pour un récepteur transmembranaire impliqué dans la régulation du développement des cellules T. Plus de la moitié des cas de LLA-T ont des mutations activatrices de *NOTCH1*. Ces mutations auraient un pronostic favorable dans le cas des LLAs-T de l'enfant (Breit, Stanulla et al. 2006).

- Fusion *NUP214-ABL1*

Cette fusion est rapportée dans 6% des LLAs-T. Elle résulte d'une amplification extra-chromosomique épisomale d'une fusion entre l'exon 31 de *NUP214* et l'exon 2 d'*ABL1* et n'est pas détectable sur caryotype. Sa valeur diagnostique est discutée, certains groupes l'associant à un plutôt mauvais pronostic alors que d'autres ne lui associent pas de valeur pronostique (Graux, Cools et al. 2004; Burmeister, Gokbuget et al. 2006).

2.3. Traitement des leucémies aiguës pédiatriques

Des progrès énormes ont été acquis durant les deux dernières décennies dans le traitement des LLAs pédiatriques (Figure 1). Aujourd'hui, les taux de survie dépassent les 80%. En effet, dans les données rapportées par le programme SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) du « *National Cancer Institute* » entre les années 1996 et 2004, la survie sans événement après 5 ans était de 84% pour les enfants de moins de 19 ans et de 88%

pour les enfants de moins de 15 ans (Ries, Melbert et al. 2008). Plusieurs facteurs de risque, à part l'anomalie génétique, sont pris en considération pour la classification des patients en groupes de risque (risque standard, haut risque ou très haut risque) afin d'administrer des traitements adéquats. Par exemple, des patients âgés de 1 à 9 ans avec un compte de leucocytes inférieur à 50 000 cellules/ μ l sont associés au groupe de risque standard (Pui and Evans 1998).

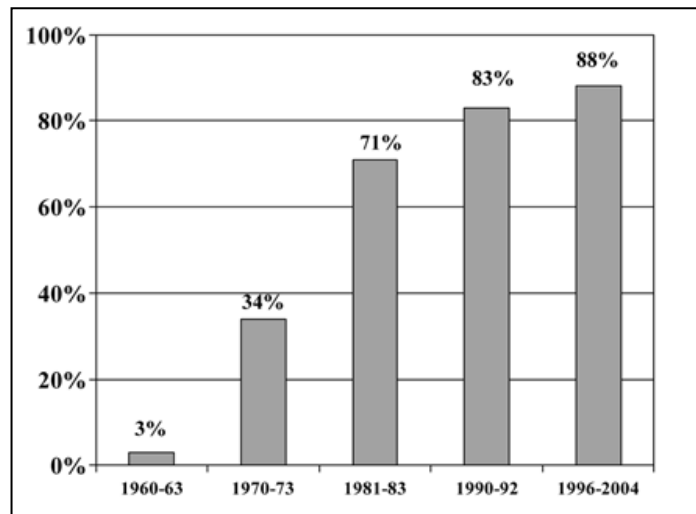


Figure 1: Amélioration de la survie des enfants atteints de leucémie lymphoblastique aiguë entre les années 1960 et 2004.

La figure montre les taux de survie à 5 ans des enfants de moins de 15 ans avec une LLA entre les années 1960 et 2004 selon les données du SEER. Tiré de Ries, 2008.

En ce qui concerne les LMAs pédiatriques, celles-ci étaient traitées, jusqu'au début des années 1970, avec des protocoles conçus pour le traitement des LLAs et donnaient des résultats médiocres. Des progrès ultérieurs ont permis d'améliorer considérablement les taux de survie. Ainsi, durant les 2 dernières décennies, la survie globale après 5 ans des enfants atteints de LMA est passée de 30% à plus de 65% (Creutzig, Zimmermann et al. 2005). De nouveaux composants thérapeutiques, l'intensification des doses, l'augmentation de la durée de la chimiothérapie d'induction, la disponibilité de donneurs compatibles apparentés dans la transplantation de moelle osseuse et la classification des leucémies par groupes de risque sont des facteurs ayant contribué à ce progrès (Kaspers and Zwaan 2007). Deux classes d'agents actifs sont utilisées dans le traitement des LMAs : les analogues de

nucléosides et les inhibiteurs de topoisomérase II. Parmi les inhibiteurs de nucléosides, l'agent le plus utilisé et le plus efficace semble être la cytarabine (Kufe, Major et al. 1980). Dans la catégorie des inhibiteurs de topoisomérase II, les anthracyclines et les agents « *anthracycline-like* » sont les agents les plus utilisés. Plusieurs mécanismes d'action seraient impliqués. En effet, ces agents sont capables d'inhiber la topoisomérase II, empêchant ainsi le relâchement de l'ADN en spirale, et donc la réplication et la transcription de l'ADN. (Minotti, Menna et al. 2004).

2.3.1. Stratégies thérapeutiques

Les thérapies actuelles sont généralement composées de plusieurs phases, dont la première est la phase d'induction visant à atteindre une rémission complète où le nombre de blastes dans la moelle osseuse est inférieur à 5%, le compte des composants du sang périphérique retourne aux valeurs normales avec rémission des sites d'atteinte extra-médullaire comme le foie. Celle-ci est suivie par la phase de consolidation et d'intensification post-rémission pour éliminer les cellules leucémiques restantes, généralement en nombre si réduit qu'elles ne sont pas détectables mais ayant le potentiel d'entraîner une rechute. Par la suite, une chimiothérapie de maintien est administrée (Absalon and Smith 2009). Dans le traitement des LLAs, il s'agit de la phase la plus longue qui dure entre 2 et 3 ans après la rémission complète. (Seibel 2008). Dans certains cas, une transplantation allogénique (de donneur compatible) de moelle osseuse est effectuée. La nécessité de la transplantation allogénique de moelle osseuse est évaluée après l'atteinte de la rémission complète selon la réponse initiale au traitement et le groupe de risque auquel est associé le patient (Absalon and Smith 2009).

2.3.2. Stratégies de traitement ciblant des réarrangements chromosomiques spécifiques

2.3.2.1. Traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë associée à la présence du chromosome de Philadelphie

Certains groupes de patients, tels que les patients portant une translocation (9;22) associée à un chromosome de Philadelphie (Ph⁺) bénéficient de la transplantation allogénique de moelle osseuse : celle-ci est associée à une meilleure survie que la chimiothérapie standard (Mori, Manabe et al. 2001). La survie, selon que le donneur soit compatible apparenté ou non-apparenté, est similaire (Arico, Schrappe et al. 2010).

L'imatinib mesylate, auparavant connu sous le nom de STI571 et commercialisé sous le nom de Gleevec, est un inhibiteur de la protéine kinase BCR-ABL1 résultant de la translocation (9 ;22). Celui-ci est central dans le traitement de la LMC de l'adulte. Dans le traitement de la LLA-B adulte, les régimes thérapeutiques ayant intégré l'imatinib ont amélioré la survie globale de ces patients, mais ceux qui ne reçoivent pas de transplantation de moelle osseuse rechutent éventuellement. Par conséquent, une meilleure survie semble être obtenue par administration d'imatinib avant ou après la transplantation de moelle osseuse allogénique (Burke, Trotz et al. 2009).

L'étude AALL0031 du COG a évalué l'effet de l'incorporation de l'imatinib dans les régimes chimiothérapeutiques intensifs chez les enfants atteints d'une LLA-Ph⁺. Tous les patients ont reçu de l'imatinib avec la chimiothérapie. Par la suite, certains ont subi une transplantation de moelle osseuse allogénique suite à la chimiothérapie de consolidation alors que d'autres ont continué à recevoir de l'imatinib jusqu'à la fin de leur traitement. La survie sans événement après 3 ans des patients ayant reçu une chimiothérapie intensive à l'imatinib était alors de 87.7% ± 10.9%, survie plus élevée que celle de patients traités par chimiothérapie sans imatinib. Par ailleurs, des résultats préliminaires suggèrent que le traitement à l'imatinib suivi de transplantation allogénique de moelle osseuse n'offre pas d'avantage comparé à la transplantation seule. Un suivi permettra de déterminer la possibilité de remplacer la transplantation de moelle par la chimiothérapie et l'administration d'imatinib. (Schultz, Bowman et al. 2009)

2.3.2.2. *Traitement de la leucémie myéloïde aiguë associée à la fusion PML-RAR α*

Les blastes formés suite à la fusion des gènes *PML* et *RAR α* dans la LPA sont ciblés avec une thérapie à l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA), commercialement connu sous le nom de Vesanoid, qui induit la maturation et qui permet d'atteindre des taux de rémission totale de 70-90% (Meshinchi and Arceci 2007). Il s'agit d'un exemple classique où l'identification d'un gène de fusion a permis le développement d'une thérapie ciblée ayant considérablement amélioré le pronostic de la leucémie associée.

Cependant, malgré les énormes progrès dans le traitement des leucémies pédiatriques aiguës, près de la moitié des patients atteints de LMA rechutent et meurent. Dans le cas des LLAs, le taux de rechute est de 15-20%. Le problème majeur dans le traitement des leucémies pédiatriques est la mortalité reliée à la toxicité des traitements et les effets secondaires à long terme dus aux fortes doses des traitements. L'identification de nouveaux facteurs pronostiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires, afin d'améliorer les taux de survie et réduire la toxicité. Une meilleure compréhension des processus biologiques de la maladie contribuera aussi au progrès dans le traitement en identifiant de nouvelles cibles thérapeutiques.

3. MÉCANISMES DES RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES ET LEURS CONSÉQUENCES POUR LES CELLULES

Les translocations réciproques, les inversions et les insertions sont les réarrangements chromosomiques principaux dans les leucémies. Parmi ces réarrangements, les translocations sont les plus fréquentes (Futreal, Coin et al. 2004) (Figure 2). Souvent, des translocations chromosomiques spécifiques sont associées à des types de leucémies spécifiques. À titre d'exemple, la translocation (15;17) se retrouve seulement dans la LPA (Chou and Dang 2005). Leur détection offre un outil diagnostique et permet de suivre l'évolution de la maladie et la réponse au traitement : un traitement efficace se traduirait par une régression du nombre de cellules portant la translocation associée. En plus de leur utilité clinique, les translocations permettent d'identifier des oncogènes ou des gènes

suppresseurs de tumeurs importants dans la leucémogénèse. Par ailleurs, le développement d'une leucémie aiguë nécessite deux événements génétiques, un premier bloquant la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, généralement une translocation, suivi d'un deuxième événement stimulant la prolifération (Kelly and Gilliland 2002). Cependant, la compréhension des mécanismes générant les translocations n'est qu'à son début.

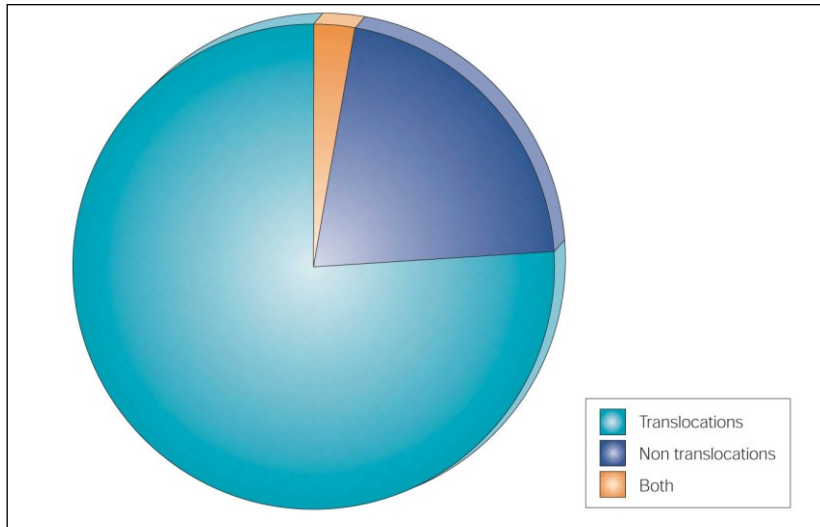


Figure 2: Proportions des gènes impliqués dans des translocations dans le cancer chez l'homme.

Les translocations sont les réarrangements les plus fréquents dans le cancer chez l'homme. Tiré de Futreal, 2004.

3.1. Les mécanismes responsables des translocations et insertions chromosomiques

Une translocation chromosomique est un échange de matériel génétique entre deux chromosomes. Pour avoir lieu, une translocation est précédée d'au moins deux cassures double brins simultanées au niveau de 2 chromosomes, qui sont mal réparées. Dans le cas d'une insertion, trois cassures double brins sont générées au niveau de deux chromosomes différents. Un fragment génomique libre ainsi généré s'insère alors au niveau de l'autre chromosome.

Les chromosomes occupent des territoires à l'intérieur du noyau cellulaire (Cremer, Cremer et al. 2006). L'échange de matériel chromosomique nécessite une proximité spatiale. Ainsi le gène *MLL* et ses partenaires de fusion *ENL* et *AF4* sont localisés à proximité dans le

noyau (Gue, Sun et al. 2006). Il est intéressant de noter qu'il existe des homologies de séquences au niveau des points de cassure des gènes *AF4*, *AF9* et *ENL*, partenaires de fusion de *MLL* (Nakamura, Alder et al. 1993). Certaines études suggèrent que suite aux cassures doubles brins, les extrémités libres créées se rapprochent pour entraîner les translocations (Aten, Stap et al. 2004). Par ailleurs, il existerait une pression sélective des cassures double brins entraînant l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Nickoloff, De Haro et al. 2008). Plusieurs hypothèses sont suggérées dans la littérature pour la génération de ces échanges chromosomiques. Le mécanisme principal de réparation des cassures double brins, le mécanisme NHEJ (*non homologous end joining*) serait à l'origine de la majorité des translocations et insertions (Richardson and Jasin 2000). Il existe deux voies de réparation NHEJ : la voie classique et la voie alternative, chacune impliquant une multitude de protéines. Cependant, ce mécanisme n'étant pas totalement efficace, il entraînerait de petites délétions et des insertions au niveau des points de cassures (Figure 3).

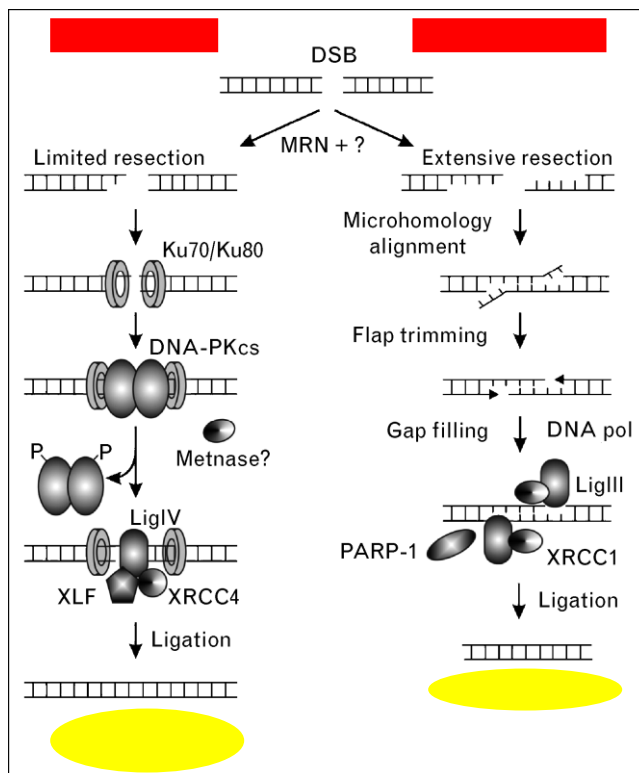


Figure 3: La réparation des cassures double brins s'effectue par deux voies NHEJ

Les deux voies de réparation NHEJ, la voie classique et la voie alternative, sont régulées par une série de protéines. DNA-PKcs: DNA-dependent protein kinase; DSB: double-strand break; MRN: MRE11/RAD50/NBS1; NHEJ: non-homologous end joining; PARP-1: poly ADP ribose polymerase-1; XRCC1: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1; XRCC4: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4. Adapté de Nickoloff, 2008.

Les cassures doubles brins sont générées de façon spontanée durant la réplication de l'ADN. Ceci entraîne un blocage de la fourche de réplication. Si la réparation n'est pas effectuée à temps, la fourche de réplication pourrait se détacher et une extrémité double brin libre, se formerait. Si cet événement a lieu simultanément au niveau de deux chromosomes différents, un échange de matériel chromosomique réciproque a lieu (Nickoloff, De Haro et al. 2008). Cet événement pourrait aussi avoir lieu à deux endroits différents sur le même chromosome, causant deux cassures sur le même chromosome, générant ainsi un fragment chromosomique pouvant s'insérer sur un autre chromosome.

Les translocations peuvent aussi résulter d'une erreur durant la recombinaison V(D)J, mécanisme de réarrangement génomique programmé pour la génération de la variété d'anticorps chez les mammifères par l'intermédiaire du mécanisme de réparation NHEJ (Lieber, Yu et al. 2006). Les translocations sont caractérisées par la juxtaposition d'un proto-oncogène aux éléments régulateurs des gènes des immunoglobulines (IG) ou des TCRs dans les hémopathies malignes. Suite à la recombinaison V(D)J, les cellules lymphoïdes B entreprennent la commutation isotypique pour générer les différentes classes d'IG durant laquelle la réparation des cassures doubles brins par le NHEJ pourrait mener à des translocations. Ceci est le cas de la translocation (8;14)(q24.21;q32.33) associée à la LLA-M3 (Burkitt-like) (Unniraman and Schatz 2006).

Dans le cas des réarrangements du gène *MLL*, une recombinaison inter- ou intrachromosomique entre les éléments Alu générée par le mécanisme de réparation SSA (*single strand annealing*) entraîne des duplications partielles en tandem (*partial tandem duplication* ou PTD) (Strout, Marcucci et al. 1998).

De plus, l'exposition à l'etoposide a été associée à des leucémies aiguës impliquant surtout des translocations des gènes *MLL* et *RUNX1* (Larson, Le Beau et al. 1992). Par ailleurs, des bris double brins sont générés par la topoisomérase II α au niveau des sites de clivage de cette enzyme qui contrôle la topologie de l'ADN. Ainsi, une réparation aberrante des cassures double brins serait à l'origine des échanges de matériel chromosomique.

3.2. Les conséquences moléculaires des translocations et insertions chromosomiques

Au niveau moléculaire, les translocations chromosomiques et les insertions entraînent l'une des conséquences suivantes : soit la dérégulation de l'expression de gènes à structure normale en plaçant la transcription d'un gène sous la régulation de régions promotrices et régulatrices d'un autre gène, soit la formation d'un gène de fusion chimérique leucémogène (Figure 4) (Frohling and Dohner 2008).

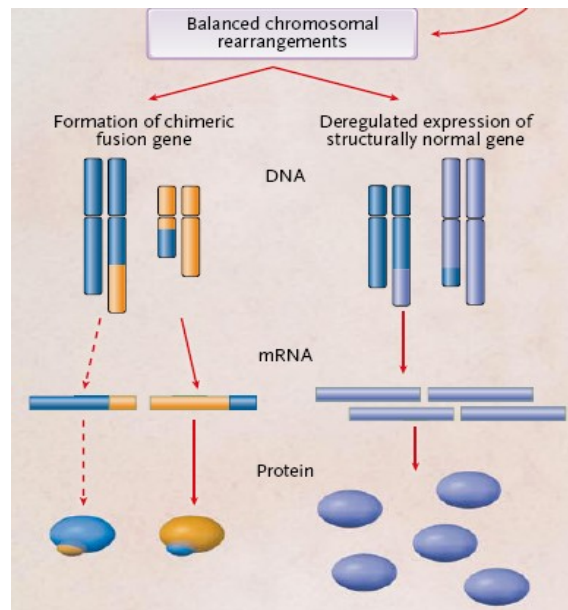


Figure 4: Conséquences moléculaires d'un réarrangement équilibré

Un réarrangement équilibré entraîne soit la formation d'une protéine chimérique soit la dérégulation de l'expression d'un gène normal. mRNA : ARN messenger. Tiré de Frohling, 2008.

3.2.1. Dérégulation de l'expression de gènes à structure normale

Des réarrangements chromosomiques peuvent entraîner le positionnement de certaines séquences régulatrices tissue-spécifiques à proximité de proto-oncogènes. Ceci a pour conséquence la dérégulation de l'expression de ce proto-oncogène. Un exemple classique de tels réarrangements existe dans le lymphome de Burkitt, où la translocation $t(8;14)(q24.21;q32.33)$ mène à l'expression constitutive du gène *MYC* (8p24.21) juxtaposé au gène d'immunoglobuline *IGHG1* (14q32.33) (Kuppers 2005).

Dans le cancer de la prostate, la délétion del(21)(q22.3q22.3) entraîne la surexpression du gène facteur de transcription *ERG* suite à la formation de la fusion *TMPRSS2-ERG* (Tomlins, Rhodes et al. 2005).

3.2.2. Formation de gènes de fusion

La majorité des réarrangements chromosomiques équilibrés résultent en la formation de gènes de fusion chimériques (Frohling and Dohner 2008). Deux grandes classes de gènes sont impliquées dans ce type de fusions : les gènes codant pour des tyrosines kinases et ceux codant pour des facteurs de transcription.

3.2.2.1. Gènes de tyrosines kinases

L'exemple classique d'anomalie chromosomique menant à la formation d'un gène de fusion est le chromosome de Philadelphie, résultant de la translocation t(9;22)(q34.1;q11.23). Cette anomalie est présente dans la majorité des cas de leucémie myéloïde chronique, dans 20% des patients avec LLA et des cas rares de LMA (Frohling and Dohner 2008). Suite à cette translocation, une portion du gène *BCR* en 22q11.23 est fusionnée au gène de tyrosine kinase *ABL1* en 9q34.1. Ceci conduit à la formation d'une protéine chimérique *BCR-ABL1* fusionnant le domaine catalytique d'*ABL1* à un domaine d'oligomérisation de *BCR* activé constitutivement. Ainsi, une activité tyrosine kinase aberrante est générée. D'autres exemples de la génération d'une activité tyrosine kinase constitutive existent, tels que la translocation t(5;12)(q31-q32;p13) fusionnant le gène *PDGFRβ* à *ETV6* dans les néoplasmes myéloïdes avec éosinophilie, la délétion de la région 4q12 fusionnant le gène *FIP1L1* à *PDGFRα* ou encore l'inversion inv(2)(p22-p21p23) générant la fusion *EML4-ALK* dans le cancer du poumon non à petites cellules.

3.2.2.2. Gènes de facteurs de transcription

Les gènes de fusion impliquant des FTs produisent des protéines chimériques dont l'activité transcriptionnelle est augmentée ou modifiée, ou des protéines chimériques dont

la fonction est de réprimer la transcription. Un exemple de protéine chimérique à activité transcriptionnelle augmentée ou modifiée est la fusion d'*EWSRI* en 22q12.2 à un membre de la famille de FTs ETS dans presque tous les cas de sarcome d'Ewing. En effet, 85% de ces patients portent la translocation (11;22)(q24.1-q24.3;q12.2) impliquant le gène *FLII* en 11q24.1-q24.3. Environ 10 % des cas de sarcome d'Ewing portent la translocation (21;22)(q22.3;q12.2) impliquant le gène *ERG* en 21q22.3. Les facteurs de transcription qui en résultent contiennent le domaine de liaison à l'ADN des membres de la famille ETS et le domaine de transactivation d'*EWSRI*, ce qui conduit à la transcription aberrante de plusieurs gènes cibles de la famille ETS (Delattre, Zucman et al. 1992; Sorensen, Lessnick et al. 1994). Par ailleurs, des réarrangements chromosomiques peuvent entraîner la formation d'une protéine réprimant la transcription. Ceci est fréquent chez les patients atteints de LMA. À titre d'exemple, la fusion *PML-RAR α* dans la LPA entraîne la fusion du domaine de liaison à l'ADN de *RAR α* au domaine de recrutement de protéines modificatrices de la chromatine de *PML*. Ceci conduit à l'inhibition aberrante de la transcription des gènes cibles de *RAR α* . Certains de ces gènes étant impliqués dans la différenciation myéloïde, des cellules myéloïdes immatures s'accumulent (Licht and Sternberg 2005).

4. L'ORIGINE PRÉNATALE DES LEUCÉMIES PÉDIATRIQUES

Il existe aujourd'hui des évidences indiquant que la majorité des leucémies pédiatriques ont une origine prénatale par l'acquisition d'altérations chromosomiques et génétiques *in utero* durant l'hématopoïèse fœtale. Ces altérations primaires prénatales ne seraient cependant pas suffisantes pour générer une leucémie : un événement génétique secondaire postnatal serait nécessaire pour la génération de la leucémie chez l'enfant.

4.1. Les évidences de l'origine prénatale des leucémies pédiatriques

Il existe aujourd'hui plusieurs évidences de l'origine prénatale de la leucémie pédiatriques. Ces évidences proviennent de différents types d'études tels que les études de jumeaux monozygotes concordants pour la leucémie, des études examinant rétrospectivement des

gouttes de sang néonatal de patients ayant ultérieurement développé la leucémie, ou encore le dépistage moléculaire de sang de cordon de patient ayant développé une leucémie.

4.1.1. Les études de jumeaux monozygotes

Des évidences sur l'origine prénatale des leucémies pédiatriques proviennent d'études sur jumeaux monozygotes identiques atteints de leucémie. Le premier cas de tels jumeaux avec une leucémie concordante a été décrit en 1882 mais ce n'est qu'en 1975 qu'une explication de ce phénomène a été suggérée : la concordance serait le résultat d'un transfert de cellules leucémiques d'un enfant à l'autre via le partage de la vascularisation du placenta monochorionique (Figure 5) (Strong and Corney 1967; Clarkson and Boyse 1971). En d'autres mots, la leucémie serait initiée chez un des deux enfants par l'acquisition de certaines anomalies génétiques et des cellules transformées (ou cellules métastatiques) seraient transférées à l'autre enfant où le clone leucémique s'établit. Les leucémies concordantes chez les jumeaux monozygotes auraient donc une origine clonale commune. Les évidences définitives de cette hypothèse ont été confiées par des études moléculaires. En effet, les points de cassures à l'origine de la formation de séquences de fusion chimériques ont lieu dans des régions introniques appelées BCRs (*breakpoint cluster regions*). Cependant, les séquences de fusion au niveau des points de cassure sont uniques, c'est-à-dire clonotypiques aux cellules leucémiques de chaque patient (Wiemels, Alexander et al. 2000; Greaves and Wiemels 2003). Elles représentent donc des marqueurs de clonalité spécifiques. La présence de la même séquence de fusion aux niveaux des blastes leucémiques de jumeaux ne s'expliquerait que par une origine monoclonale prénatale de leurs leucémies.

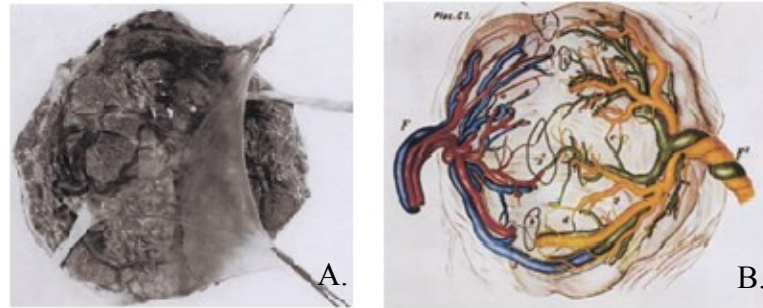


Figure 5: Le partage de la vascularisation du placenta monochorionique

A. Photographie d'un placenta monochorionique. **B.** Représentation du partage de la vascularisation par les jumeaux identiques dans le placenta monochorionique. Tiré de Strong, 1967.

Des études visant à comparer les séquences de fusion des blastes de jumeaux monozygotes ont été réalisées. Dans le cadre d'une étude initiée dans les années 1980 par le LRF (*Leukemia Research Fund*), 19 paires de jumeaux monozygotes concordants pour la leucémie, majoritairement lymphoblastique, ont été collectées. Les données moléculaires de 11 cas sont disponibles et leurs sous-types et âges sont indiqués dans la figure 6. Dans cette série, 4 cas de fusion *ETV6-RUNX1* sont étudiés. Les séquences de fusion ont été caractérisées par clonage (Ford, Bennett et al. 1998) ou par PCR suivi de séquençage (Wiemels, Cazzaniga et al. 1999; Wiemels, Ford et al. 1999; Maia, Koechling et al. 2004) et pour chaque paire de jumeaux, la même séquence de fusion a été retrouvée, indiquant une origine prénatale monoclonale de leur leucémie (Figure 7). Il en est de même pour les autres cas portant d'autres réarrangements où la monoclonalité a été démontrée. Ainsi de telles études ont permis d'établir l'origine prénatale monoclonale chez les jumeaux monozygotes atteints de leucémie concordante.

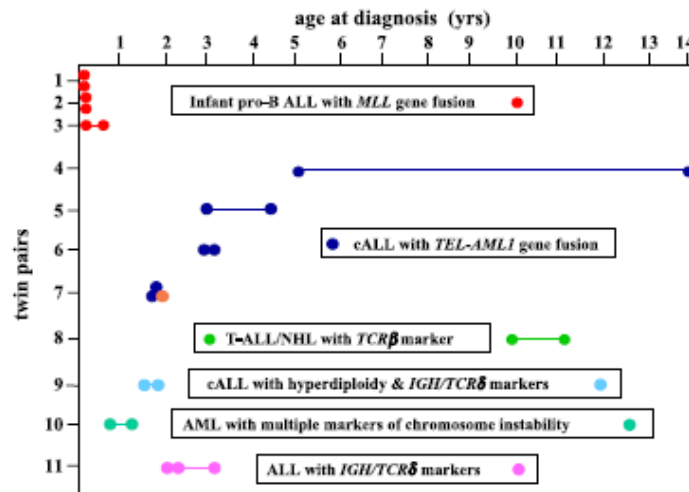


Figure 6: La concordance de la leucémie chez des jumeaux monozygotes: la série LRF (1993-2003)

La figure illustre l'âge au diagnostic pour chacune des 11 paires étudiées, le sous-type de leur leucémie et les marqueurs de clonalité utilisés. Tiré de Greaves, 2003.

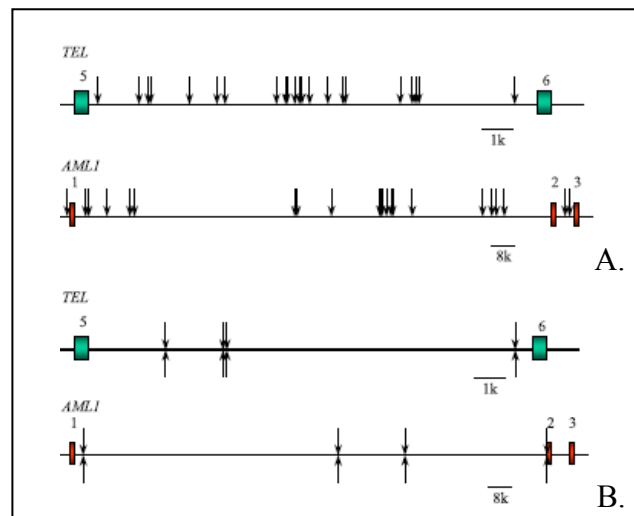


Figure 7: Points de cassure clonotypiques de la fusion *ETV6-RUNX1*

A. Points de cassure au niveau des gènes *ETV6(TEL)* et *RUNX1(AML1)* de différents patients pédiatriques atteints de LLA. Chaque flèche représente le point de cassure séquencé d'un patient.

B. Des points de cassures identiques ont été retrouvés dans les cellules leucémiques de chaque paire de jumeaux indiqués par les flèches. Tiré de Greaves, 2003.

Plus de 70 cas de jumeaux monozygotes concordants pour leur leucémie sont rapportés, dont la moitié sont des nourrissons (moins de 1 an). En effet, il semblerait que la

concordance de la leucémie aiguë pédiatrique entre la naissance et l'âge de 15 ans varie entre 5% et 25%, avec un taux plus élevé chez les nourrissons (Greaves, Maia et al. 2003). Ceci est à comparer avec des taux de concordance de la leucémie aiguë de moins de 1% chez les adultes. En assumant que la leucémie chez les jumeaux et les non-jumeaux est biologiquement la même, il est accepté que la majorité des leucémies pédiatriques sont monoclonales et d'origine prénatale. Ce premier événement prénatal ne serait cependant pas suffisant pour l'apparition de la leucémie ; un deuxième événement génétique rare, postnatal, serait nécessaire et pour lequel les jumeaux seraient discordants (Figure 8) (Kempski, Mensa-Bonsu et al. 2003).

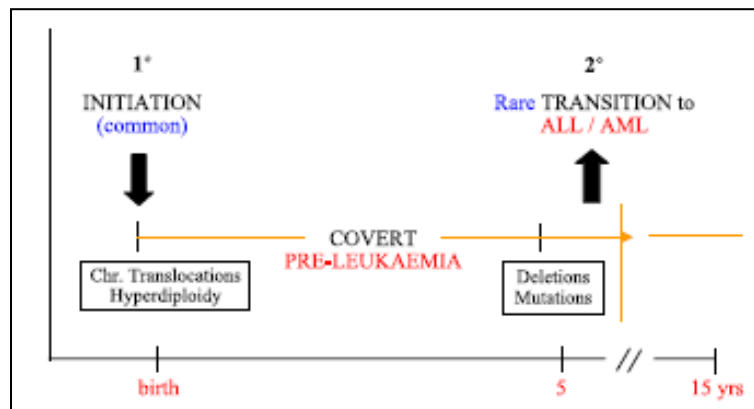


Figure 8: Modèle de l'apparition de la leucémie aiguë de l'enfant

Un événement prénatal initie le clone préleucémique. Un deuxième événement postnatal rare est nécessaire pour la transition vers la leucémie aiguë. Tiré de Greaves, 2003.

4.1.2. Examen rétrospectif de gouttes de sang néonatal

L'évidence directe de l'origine prénatale de la leucémie pédiatrique provient d'études ayant vérifié la présence du gène de fusion clonotypique sur des gouttes de sang archivé de patients ayant ultérieurement développé la leucémie (Wiemels, Cazzaniga et al. 1999; Wiemels, Xiao et al. 2002). À titre d'exemple, une telle étude a testé cela chez trois enfants portant la fusion *MLL-AF4* associée à une LLA : la séquence de fusion est déterminée par PCR et séquençage sur l'échantillon de diagnostic et les mêmes amorces sont utilisées pour

détecter la fusion sur le sang néonatal. Les trois cas ont montré un résultat positif (Gale, Ford et al. 1997).

4.1.3. Dépistage moléculaire sur sang de cordon

Deux événements génétiques sont nécessaires pour l'apparition de la leucémie : des clones préleucémiques seraient présents dans le sang de nouveau-nés non leucémique et ceci à une fréquence plus élevée que l'incidence de la maladie. À l'appui de cette hypothèse, Mori et collaborateurs ont retrouvé les fusions *ETV6-RUNX1* et *RUNX1-RUNX1T1* présentes sur du sang de cordon de nouveau-nés non présélectionnés, à une fréquence 100 fois plus élevée que l'incidence de la leucémie associée (Mori, Colman et al. 2002).

Ainsi il existe aujourd'hui de multiples évidences en faveur de l'origine prénatale de la majorité des leucémies pédiatriques. Quel que soit le mécanisme par lequel les altérations prénatales sont générées, l'acquisition d'un événement génétique secondaire postnatal est centrale dans l'étiologie des leucémies pédiatriques.

4.2. Anomalie chromosomique d'origine prénatale : la fusion *ETV6-RUNX1*

Il est aujourd'hui établi que la majorité des cas de leucémie pédiatrique avec la fusion *ETV6-RUNX1*, résultant de la translocation (12;21)(p13;q22), est d'origine prénatale. Les évidences proviennent de plusieurs études dont la première, en 1998, a démontré une séquence de fusion unique d'*ETV6-RUNX1* chez une paire de jumeaux monozygotes avec une LLA concordante (Ford, Bennett et al. 1998). Comme pour les autres réarrangements ayant lieu *in utero*, un événement postnatal secondaire est nécessaire pour l'apparition de la leucémie. Ainsi la latence peut être prolongée, atteignant 14 ans (Wiemels, Ford et al. 1999). Dans une étude de 2004, sur six patients ayant développé une LLA associée à la fusion *ETV6-RUNX1* à un âge supérieur à 5 ans, il était possible de détecter la fusion sur les cartes Guthrie de trois d'entre eux. Un des patients a développé la leucémie à l'âge de 9 ans. Les auteurs n'excluent pas la possibilité d'une origine prénatale de la fusion des autres patients ayant testé négatifs. Les faux négatifs résulteraient d'un nombre faible de cellules

leucémiques dans le sang néonatal ou une sensibilité inadéquate des PCRs (Maia, Koechling et al. 2004). 70% des LLAs pédiatriques avec fusion *ETV6-RUNXI* sont associés à la perte de l'allèle non réarrangé d'*ETV6*, ce qui pourrait indiquer que cette perte serait l'événement secondaire menant à l'apparition de la leucémie aiguë (Kempski, Chalker et al. 1999). Dans d'autres cas, la deuxième copie d'*ETV6* est détectée par FISH mais son expression est absente, indiquant que des délétions submicroscopiques ou des mutations ponctuelles pourraient être des événements secondaires (Patel, Goff et al. 2003). La délétion de l'allèle normal d'*ETV6* conférerait un avantage sélectif aux cellules portant une fusion *ETV6-RUNXI*, lié à une fonction de suppresseur de tumeur d'*ETV6* ou à la capacité de la protéine ETV6 de former un dimère avec la protéine ETV6-RUNXI réduisant ainsi son activité de transformation (Rompaey, Potter et al. 2000). Un variant de la translocation t(12;21), impliquant quatre chromosomes et associé à la fusion *ETV6-RUNXI* dans le contexte d'un caryotype complexe a été rapporté chez une paire de jumeaux monozygotes (Broadfield, Hain et al. 2004).

Le gène *RUNXI* ou *AML1*, codant pour un facteur de transcription, a été identifié pour la première fois impliqué dans une fusion avec le gène *RUNX1T1* dans la translocation (8;21)(q22;q22) dans la LMA (Miyoshi, Shimizu et al. 1991). D'autres partenaires de fusion ont par la suite été identifiés, tels que le gène *ETV6* (Golub, Barker et al. 1995; Romana, Mauchauffe et al. 1995) ou encore *EVII* (Mitani, Ogawa et al. 1994). Le gène *ETV6* codant pour un facteur de transcription, a été identifié dans une fusion avec le gène *PDGFRβ* dans la translocation (5;12)(q33;p13) (Golub, Barker et al. 1994) avant que d'autres partenaires de fusion ne soient identifiés, tels que les gènes *ABL1* (Papadopoulos, Ridge et al. 1995) et *RUNXI* (Romana, Mauchauffe et al. 1995).

Dans la fusion *ETV6-RUNXI*, le domaine PD (*pointed domain*) et le domaine de répression d'*ETV6* sont conservés et tous les domaines fonctionnels de *RUNXI* sont conservés, tels que le domaine RUNT de liaison à l'ADN (Figure 9).

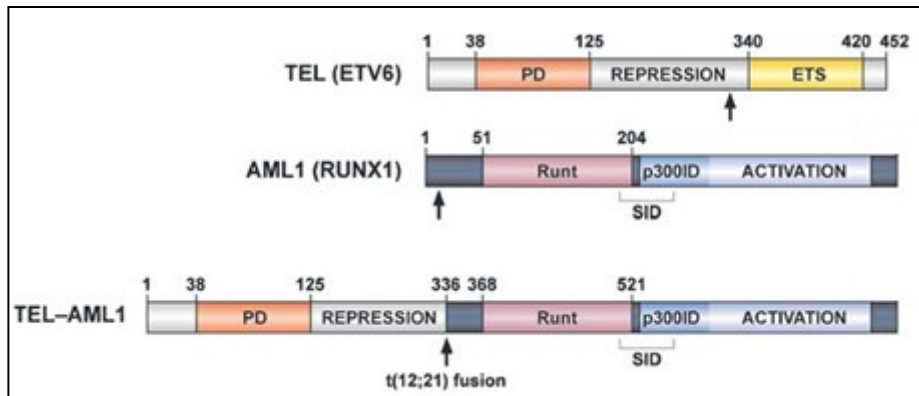


Figure 9: Les protéines ETV6, RUNX1 et ETV6-RUNX1

Le domaine RUNT, le domaine d'interaction avec mSin3A (SID), une région d'interaction avec p300 HAT (p300 ID) et le domaine d'activation transcriptionnelle de RUNX1 sont indiqués. Les domaines fonctionnels d'ETV6, tels que le domaine d'oligomérisation (domaine PD), le domaine de répression et le domaine ETS de liaison à l'ADN sont aussi indiqués. Tiré de Zelent, 2004 (Zelent, Greaves et al. 2004).

Les points de cassures au niveau du gène *ETV6* se situent dans une région de 12 kilobases (kb) de l'intron 5 et une région d'environ 100kb de l'intron 1 de *RUNX1* mais comme pour les autres fusions, les points de cassure de chaque patient sont uniques (Figure 7).

RUNX1 est un activateur de la transcription qui se lie à l'ADN via sa dimérisation avec la protéine régulatrice CBF β (Ogawa, Inuzuka et al. 1993). En interagissant avec p300 HAT (histone acétyltransferase) et d'autres HATs, il est impliqué dans la différenciation de la lignée myéloïde et l'activation de l'expression de gènes cibles (Kitabayashi, Yokoyama et al. 1998). Dans certains contextes cellulaires, *RUNX1* a une fonction de répresseur de la transcription en interagissant avec le corépresseur mSin3A et des HDACs (histones déacétylases) (Figure 10A.) (Lutterbach, Westendorf et al. 2000). L'association de RUNX1 avec mSin3A est régulée par phosphorylation: sa phosphorylation entraîne sa dissociation de mSin3A (Imai, Kurokawa et al. 2004). De son côté, la fusion ETV6-RUNX1 a une fonction de répression de la transcription par recrutement de HDACs et corépresseurs (N-CoR: *nuclear receptor corepressor*). Ainsi la fusion du domaine de liaison à l'ADN de *RUNX1* avec *ETV6* mènerait à une répression constitutive de la transcription HDAC-

dépendante et contribuerait à la leucémogénèse par l'altération de l'expression des gènes cibles de *RUNX1* (Zelent, Greaves et al. 2004) (Figure 10B.).

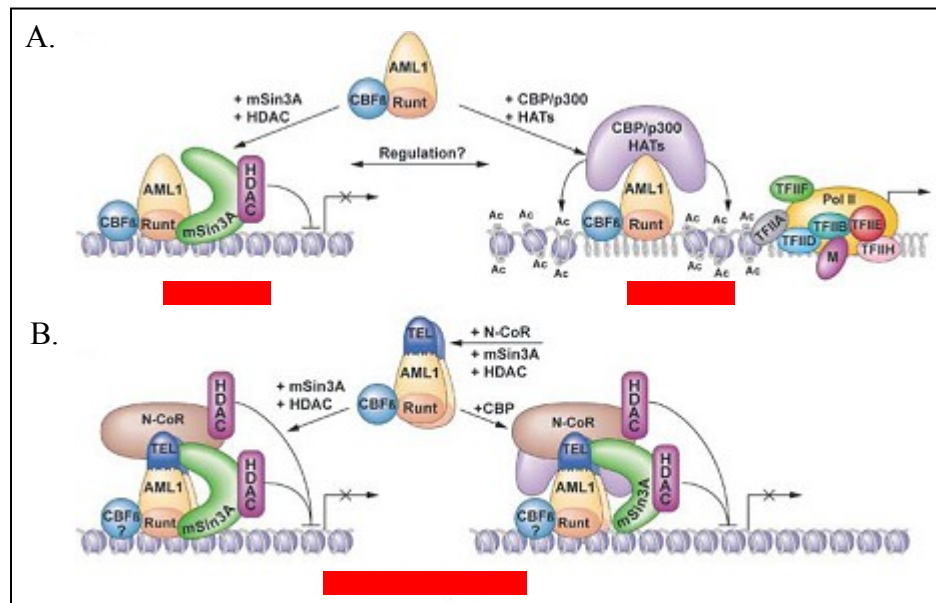


Figure 10: Modèle d'action de la protéine RUNX1 et la fusion ETV6-RUNX1

A. RUNX1(AML1) se lie à l'ADN en association avec CBF β et agit en activant ou réprimant la transcription par le recrutement de différents facteurs. **B.** La protéine de fusion ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) réprime constitutivement la transcription de façon HDAC-dépendante dérégulant l'expression des cibles de RUNX1. Adapté de Zelent, 2004.

5. OBJECTIFS

Des progrès majeurs ont été réalisés durant les deux dernières décennies dans la compréhension et le traitement des leucémies aiguës pédiatriques. Des cibles thérapeutiques potentielles ont ainsi été identifiées et des molécules dirigées contre ces cibles ont été développées par la recherche académique et industrielle. Ces cibles thérapeutiques sont généralement spécifiques des réarrangements chromosomiques. Ainsi, l'efficacité thérapeutique d'un inhibiteur spécifique de la tyrosine kinase BCR-ABL1 générée par la translocation t(9;22) et de l'acide rétinoïque dans le cas de l'oncogène *PML-RAR α* généré par la translocation t(15;17) démontre le rôle central de ces remaniements chromosomiques dans la leucémogénèse. Cependant, plusieurs anomalies restent à

investiguer et les rechutes ainsi que la résistance aux traitements chez certains patients ne sont pas rares. Dans le but ultime d'améliorer le traitement des leucémies aiguës pédiatriques, il est nécessaire d'acquérir une meilleure compréhension de la biologie de la maladie. Ceci implique la mise en évidence d'anomalies génétiques et la compréhension des altérations moléculaires menant à la dérégulation des processus cellulaires majeurs, tels que la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Ceci permettrait éventuellement de mettre au point des outils de diagnostic et/ou de pronostic supplémentaires. Il est urgent de développer de nouvelles approches thérapeutiques, comme des agents ciblant de nouvelles anomalies génétiques spécifiques de la cellule souche leucémique (Rubnitz 2008).

Le but de ce projet de maîtrise est l'identification de nouveaux réarrangements chromosomiques ou des réarrangements non caractérisés dans les LMAs et LLAs pédiatriques en utilisant une stratégie de dépistage des anomalies chromosomiques par techniques cytogénétiques et moléculaires.

Les objectifs sont :

- 1) La délimitation, par la technique de FISH, des régions impliquées dans de nouveaux réarrangements chromosomiques mis en évidence par une stratégie de dépistage
- 2) L'identification des gènes impliqués
- 3) L'étude d'expression des gènes altérés

Ainsi, deux réarrangements chromosomiques ont été étudiés, dans le but de mettre en évidence de nouveaux mécanismes de la leucémogénèse. D'une part, une insertion chromosomique (X;6) détectée chez une paire de jumelles, diagnostiquées aux âges de 7 et 10 semaines de vie respectivement avec une LMA, a été étudiée. D'autre part, trois cas de translocation (12;13), similaires au niveau des caryotypes, dont un dans une LLA et deux dans des LMAs, ont été investigués.

Dans ce rapport, les techniques et outils utilisés dans cette étude seront décrits et les résultats obtenus pour chaque réarrangement présentés et discutés.

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

Afin de mettre en évidence de nouveaux réarrangements dans les leucémies aiguës pédiatriques, 100 cas reçus au laboratoire de cytogénétique postnatale de l'hôpital Ste Justine entre les années 2007 et 2009 ont été répertoriés et le matériel correspondant (dossier, analyses et résultats) récupérés. Les caryotypes déjà réalisés dans le cadre de l'analyse clinique ont été réexaminés. Par la suite, un panel de sonde pour la FISH a été établi et appliqué après une revue exhaustive de la littérature. La combinaison de l'analyse caryotypique et de la FISH a permis de mettre en évidence dans un cadre clinique des réarrangements récurrents non rapportés ainsi que des réarrangements rapportés dans la littérature mais sans caractérisation des points de cassure. Parmi ceux-là, deux réarrangements ont été sélectionnés dans le cadre de la recherche pour une analyse plus approfondie afin de caractériser d'une part les points de cassure par FISH en utilisant des sondes choisies après analyse des caryotypes et de quantifier d'autre part l'expression des gènes impliqués par PCR quantitatif en temps réel (RT-qPCR : real-time quantitative polymerase chain reaction). Les autres cas identifiés ne seront donc pas présentés dans ce mémoire.

L'approbation du comité d'éthique de la recherche du CHU Ste-Justine, ainsi que le consentement des patients, ont été reçus pour l'étude moléculaire.

2. IDENTIFICATION DES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES PAR ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE STANDARD

La cytogénétique standard permet d'obtenir un caryotype, c'est-à-dire l'arrangement des chromosomes d'une cellule donnant une vue d'ensemble du génome. Elle permet ainsi l'identification des chromosomes et la détection d'aberrations chromosomiques de nombre et de structure de grande taille, à une résolution minimale de 10 mégabases (Mb).

2.1. Obtention du caryotype en bandes GTG

Afin d'obtenir des chromosomes en métaphase avec des bandes distinctes, une série d'étapes est nécessaire, incluant la culture cellulaire et l'arrêt des cellules en métaphase, la récolte, et le marquage des chromosomes.

2.1.1. La culture cellulaire

La mise en culture est effectuée stérilement suite à une numération des cellules par millilitre (ml) de l'échantillon à l'aide d'un hématimètre. Le milieu de culture utilisé pour la culture de cellules de moelle osseuse est constitué de 1.5 mL de MarrowMax Bone Marrow Medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada, cat n°12260014) et de 3.5 mL de RPMI reconstitué.

- Le MarrowMax Bone Marrow Medium est constitué d'un milieu de base enrichi en sérum de veau fœtal, auquel s'ajoutent de la gentamicine, du L-glutamine et un milieu conditionné exclusif fabriqué à l'aide d'une lignée cellulaire stromale de moelle osseuse humaine.
- Le RPMI reconstitué contient un milieu de base, de la L-glutamine, de la garamycine (un antibiotique), du sérum de veau fœtal, et des facteurs de croissance.

Pour chaque spécimen, plusieurs échantillons sont mis en culture pour des durées différentes (généralement 24h et 48h) afin de maximiser le nombre et la qualité des mitoses obtenues. La culture est effectuée dans une étuve à CO₂ à 5% à 37°C.

2.1.2. La récolte

Cette étape permet de recueillir des cellules en mitose. Pour cela, les cellules en culture sont bloquées en métaphase, traitées avec une solution hypotonique, fixées et étalées sur des lames pour analyse.

2.1.2.1. Traitement à la colcémide

La colcémide est un inhibiteur du fuseau mitotique qui permet de bloquer les cellules en métaphase. Elle est ajoutée à une concentration finale de 0.05µg/ml à 37°C pendant des

durées différentes dans chaque échantillon du même patient (certains sont exposés à 3h de colcémide avant la récolte alors que d'autres à 4h).

2.1.2.2. *Choc hypotonique*

Suite à une centrifugation, les cellules sont exposées à un choc hypotonique d'une solution préchauffée de chlorure de potassium (KCL) à 0.075M pendant 20 minutes à 37°C : par un effet d'osmose, les cellules sont ainsi gonflées pour fragiliser la membrane cytoplasmique en vue de l'étalement des chromosomes.

2.1.2.3. *Fixation*

Après centrifugation et décantation, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de Carnoy II (60% d'éthanol, 30% de chloroforme et 10% d'acide acétique) pendant 15 minutes à température pièce, suivi de 2 lavages avec une solution de Carnoy I (25% d'acide acétique glacial et 75% de méthanol). À l'issue de ces étapes, les cellules sont prêtes pour l'étalement.

2.1.2.4. *Étalement*

La mise des cellules sur lames s'effectue dans une chambre permettant de contrôler les conditions d'humidité et de température (Thermotron, MI, USA). À l'aide d'une pipette pasteur, des gouttes de la suspension obtenue sont déposées sur lames et leur qualité est vérifiée à l'aide d'un microscope en contraste de phase après leur séchage. La qualité de l'étalement peut alors être améliorée en ajustant la concentration du culot cellulaire et de l'angle de dépôt de la goutte.

Suite au vieillissement des lames à 60°C pendant une nuit ou à température pièce pendant 4 à 10 jours, le marquage des chromosomes en bandes G peut être effectué.

Il est préférable de laisser sécher les lames à l'air libre pour la FISH.

2.1.3. Marquage des chromosomes

Afin d'obtenir un profil de bandes sur chaque chromosome, le marquage GTG (bandes G obtenues par Trypsine et Giemsa) est employé. Les lames sont traitées avec l'enzyme trypsine à des temps variables selon la qualité des bandes obtenues. Celle-ci est évaluée au microscope après coloration des bandes au Giemsa. Suite au traitement à la trypsine, un rinçage dans un bain d'éthanol 70% est effectué, suivi par la coloration au Giemsa 4% durant 3 à 5 minutes, et deux rinçages successifs dans des bains d'eau. Les lames sont ainsi prêtes pour être examinées pour la recherche d'aberrations chromosomiques. 25 métaphases sont analysées pour chaque patient.

Dans notre étude, les caryotypes étaient déjà réalisés dans le cadre clinique. Ceux-ci ont donc été réexaminés seulement. En ce qui concerne les caryotypes dont la qualité était médiocre et lorsque du culot cellulaire était disponible, l'étalement et le marquage ont été répétés afin de permettre une analyse plus précise.

La nature des cellules leucémiques ne permet pas d'obtenir des résolutions élevées et donc les réarrangements cryptiques pourraient être manqués. Pour compléter cette technique de détection d'anomalies chromosomiques, la FISH est effectuée en parallèle.

3. ÉTABLISSEMENT D'UN NOUVEAU PANEL POUR L'IDENTIFICATION DES RÉARRANGMENTS GÉNIQUES DANS LES LEUCÉMIES LYMPHOBLASTIQUES AIGÜES ET LES LEUCÉMIES MYÉLOÏDES AIGÜES PÉDIATRIQUES PAR FISH

La FISH est une technique cytogénétique utilisée pour détecter et localiser la présence ou l'absence d'une séquence ciblée à l'aide de séquences complémentaires marquées en fluorescence appelées sondes. Elle permet donc la détection de réarrangements et d'anomalies de nombre de copies d'un gène.

3.1. Technique de FISH

La veille de la technique, les lames sont placées dans du Carnoy I pour la nuit.

La technique de FISH sur mitoses consiste en 3 étapes : le prétraitement, puis préparation des sondes et hybridation et enfin le lavage et la coloration.

Même si la technique est établie, il a parfois été nécessaire d'optimiser chaque étape lors de l'hybridation des BACs, dépendamment de la taille du BAC et de sa séquence.

3.1.1. Prétraitement

Les lames sont mises dans une étuve à 37°C pendant 2 heures, puis placées successivement dans différents bains à 37°C préparés auparavant dans l'ordre qui suit:

- Solution de RNase pendant 30 minutes afin d'éliminer l'ARN endogène,
- Éthanol 70% pendant 2 minutes,
- Éthanol 80% pendant 2 minutes,
- Éthanol 95% pendant 2 minutes.

→ Les bains d'éthanol permettent de déshydrater les lames.

Par la suite, les lames sont laissées sécher à température pièce.

3.1.2. Préparation des sondes et hybridation

Deux types de sondes sont utilisés dans ce projet : des sondes commerciales et des BACs (Bacterial Artificial Chromosomes).

Les sondes commerciales sont locus spécifiques ayant une taille qui varie entre 100 et 1500 Kb et sont validées par le fournisseur, ce qui rend l'interprétation de l'hybridation assez facile.

Les BACs sont aussi des sondes locus spécifiques mais ne sont pas toujours validées. Certaines difficultés dans l'emploi de ce type de sonde existent à cause de l'intensité des signaux pas toujours facile à détecter, ou d'hybridations non spécifiques. Leur hybridation nécessite donc une validation de la position de l'hybridation et de l'intensité du signal. Cependant leur taille variant de 150 à 300 Kb, elles sont plus utiles dans la détection de

régions non couvertes par des sondes commerciales ou dans la caractérisation précise de points de cassures. La liste des sondes utilisées sera décrite ici-bas.

Les sondes sont généralement préservées à -20°C à l'abri de la lumière. Avant leur usage, elles sont décongelées dans un bain-marie à 37°C pendant 3 minutes. Les sondes sont ensuite diluées dans les proportions suivantes : $1\mu\text{L}$ de sonde, $0.5\mu\text{L}$ d'eau déionisée filtrée et $3.5\mu\text{L}$ de tampon Vysis et placées sur une zone riche en mitose prédéfinie sur la lame. Les gouttes sont ensuite recouvertes par une lamelle et les lames placées dans un ThermobriteTM (Abbott Molecular) pour une dénaturation de 2 minutes à 75°C . Ceci permet la dénaturation de l'ADN chromosomique et de la sonde. Par la suite, les lames sont mises dans une chambre de formamide dans l'étuve à 37°C pour la nuit pour permettre l'hybridation de la sonde sur les régions chromosomiques complémentaires.

3.1.3. Lavage et coloration

Le lendemain, les lames sont passées dans les bains suivants successivement :

- 2xSSC (*saline-sodium citrate*) à 37°C pour 2 minutes. Les lamelles sont enlevées lors de ce bain.
- 0,4xSSC à 73°C pour 2 minutes
- 2xSSC à température ambiante pour 1 minute
- PBS à température ambiante pour 30 secondes.

Les chromosomes sont ensuite mis en évidence par une contre-coloration au 4',6-diaminido-2-phénylindole (DAPI) (125ng/mL , Abbott Molecular).

3.1.4. Analyse

Les lames ont été analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss Axiophot (Carl Zeiss Canada Ltd, Toronto, ON, Canada) et les photos prises grâce au logiciel Cytovision 2.0 (Applied Imaging, Newcastle, UK). 100 cellules ont été analysées pour chaque sonde.

3.2. Panels établis

Afin de maximiser les taux de détection d'anomalies chromosomiques dans les LLAs et les LMAs pédiatriques, deux panels ont été établis, suite à une revue de la littérature. Le choix de sondes pour les panels était orienté vers l'usage de sondes commerciales déjà utilisées en clinique afin de faciliter la lecture et d'optimiser le temps d'analyse dans le cadre clinique. Les sondes ont toutes été testées sur des noyaux interphasiques et des mitoses de cellules diploïdes sans anomalies (sang périphérique) afin de s'assurer de la spécificité de l'hybridation et de l'intensité des signaux émis. Différentes sondes ont été combinées sur la même lame quand les fluorochromes dans lesquels elles étaient commercialisées étaient différents afin d'utiliser le minimum de lame possible par cas.

3.2.1. Panel des leucémies lymphoblastiques aiguës

Les sondes incluses dans le panel des LLAs proviennent toutes de Vysis (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). Elles sont listées dans le tableau I. Leur localisation plus détaillée se trouve dans l'annexe 1.

En tout, 19 régions sont ciblées dans le panel des LLA combinées sur un total de 10 lames par patient. Si les lames contiennent un nombre important de mitoses et/ou noyaux, il est possible d'appliquer 2 combinaisons de 2 sondes sur la même lame en délimitant 2 régions différentes. Le nombre de lames serait alors réduit à 5 lames par patient.

Sur la lame 1, la sonde LSI IGH dual color était appliquée. Cette sonde, étant une breakapart, permet de détecter tous les réarrangements du locus *IGH* en 14q32. Elle permet donc d'identifier non seulement la présence d'un réarrangement de ce locus mais aussi d'identifier le chromosome partenaire (et si connu, le gène partenaire).

Sur une deuxième lame, la sonde LSI WHS/CEP4 cible le locus 4p16.3 et le centromère du chromosome 4. La combinaison de la sonde centromérique et la sonde en 4p16.3 comme sonde contrôle, permet de dénombrer le chromosome 4, souvent impliqué dans l'hyperdiploïdie.

Sur la lame 3 sont combinées les sondes LSI ETV6 dual color et CEP10, ciblant respectivement le locus 12p13 et le centromère du chromosome 10. Alors que la première

permet de détecter les translocations d'*ETV6* et d'identifier la multitude de partenaires de fusion de ce gène, la deuxième permet de dénombrer le chromosome 10 impliqué dans l'hyperdiploïdie.

Sur la lame 4 étaient combinées les sondes LSI *MLL* dual color et CEP17. La sonde breakapart de *MLL* permet de détecter les réarrangements de ce locus en 11q23 et d'identifier le chromosome partenaire. Elle permet de distinguer les différents partenaires de fusion et offre donc la possibilité d'identifier de nouveaux partenaires de fusion. La sonde ciblant le centromère du chromosome 17 permet de dénombrer le chromosome 17. En effet, il est important de dénombrer les chromosomes 4,10 et 17 dont la trisomie dans les cas d'hyperdiploïdie confère un meilleur pronostic dans les cas de LLA.

La lame 5 combine les sondes LSI *CDKN2A*, CEP9 et LSI *MYB*. La sonde LSI *CDKN2A* cible le gène *P16* en 9p21, dont la délétion est fréquente dans les LLAs pédiatriques. L'usage simultané du centromère du chromosome 9 permet de distinguer la délétion des anomalies de nombre pouvant toucher le chromosome et de confirmer la délétion. La sonde LSI *MYB* cible une région du bras long du chromosome 6, fréquemment délétée dans les LLAs.

Sur la lame 6 est appliquée la sonde LSI *BCR/ABL ES (extra signal)*. L'utilité de cette sonde est non seulement de permettre de détecter la translocation (9,22)(q34;q11.2) mais aussi de faire la distinction entre le point de cassure majeur et mineur sur le chromosome 22, donnant chacun un profil d'hybridation différent. Par ailleurs, elle permet de mettre en évidence des délétions sur le chromosome 9 (5' du point de cassure au niveau du gène *ABL1*).

Sur la lame 7 sont utilisées les sondes *D7S486* et CEP7 ciblant le bras long du chromosome 7 et le centromère de ce chromosome respectivement, ajoutant un outil pour dénombrer le chromosome et de détecter les délétions du bras long pouvant surgir comme anomalies secondaires.

La sonde LSI *TCF3/PBX1* dual color dual fusion de la lame 8 permet de mettre en évidence la translocation (1;19)(q23;p13).

Sur la lame 9, la sonde LSI ETO/AML-1 dual color dual fusion permet de détecter les réarrangements de *RUNX1*. Cependant, l'usage de cette sonde pourrait porter confusion dans le cas où 3 signaux de *RUNX1* sont détectés sur noyaux interphasiques avec réarrangement d'*ETV6*. En effet, ceci pourrait être interprété soit comme la présence d'une translocation (12;21)(p13;q22) soit un réarrangement d'*ETV6* avec un autre chromosome et une trisomie 21 comme anomalie secondaire. Pour faire la distinction entre ces 2 cas, une dernière lame est utilisée, sur laquelle est appliquée la sonde aneuvysion LSI 13/21 permettant de dénombrer le chromosome 21. De plus, l'emploi de cette sonde permet de détecter les délétions 13q rapportées dans les LLAs et des translocations impliquant la région 13q14.

Lame	Sonde	Longueur (Kb)	Site d'hybridation	Fluorochrome
1.	Vysis LSI IGH dual color breakapart	250 et 900	14q32	Spectrum Orange et Spectrum Green
2.	Vysis LSI WHS/Vysis CEP4	90/ Alpha satellite	4p16.3/ 4p11-q11	Spectrum Orange/ Spectrum Green
3.	Vysis LSI ETV6 dual color breakapart/Vysis CEP10	632 et 486/ Alpha satellite	12p13/ 10p11-q11	Spectrum Green et Spectrum Orange/ Spectrum Aqua
4.	Vysis LSI MLL dual color breakapart	350 et 190	11q23	Spectrum Green et Spectrum Orange
5.	Vysis LSI CDKN2A/CEP9/Vysis LSI MYB	222/Alpha satellite/740	9p21/9p11-q11/6q23	Spectrum Orange/ Spectrum Green/ Spectrum Aqua
6.	Vysis LSI BCR/ABL ES dual color	300/650	22q11.2 et 9q34	Spectrum Green et Spectrum Orange
7.	Vysis D7S486/CEP7	308/Alpha satellite	7q31/7p11.1-q11.1	Spectrum Orange/ Spectrum Green
8.	Vysis LSI TCF3/PBX1 dual color dual fusion	730/635	19p13.3/1q23	Spectrum Green/ Spectrum Orange
9.	Vysis LSI ETO/AML-1 dual color dual fusion	480/1300	8q22/21q22	Spectrum Orange/ Spectrum Green

10.	Vysis Aneuvysion LSI 13/21	440/200	13q14/21q22.13-22.2	Spectrum Green/ Spectrum Orange
-----	----------------------------	---------	---------------------	------------------------------------

Tableau I: Sondes utilisées en FISH pour mettre en évidence les anomalies chromosomiques fréquentes ainsi que de nouveaux réarrangements dans les leucémies lymphoblastiques aiguës pédiatriques

3.2.2. Panel des leucémies myéloïdes aiguës

Les sondes incluses dans le panel des LMAs proviennent aussi toutes de Vysis (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). Elles sont listées dans le tableau II. La localisation plus détaillée se trouve dans l'annexe 2.

En tout, 14 régions chromosomiques sont ciblées dans le panel des LMAs, combinées sur un total de 9 lames par patient, nombre pouvant être réduite à 5 si la combinaison de 2 lames en une seule est possible.

Sur la première lame, la sonde D7S486/CEP7 permet de dénombrer le chromosome 7 (pour identifier les monosomies 7) et de détecter les délétions 7q.

Sur la lame 2, la sonde LSI EGR1/ LSI D5S23, D5S721 permet de mettre en évidence les délétions 5q et les monosomies 5.

Sur la lame 3, il est possible de mettre en évidence la translocation (8;21)(q22;q22) et ses variants avec la sonde LSI ETO/AML-1 dual color dual fusion. Par ailleurs, elle permet de détecter la trisomie 8 comme seule anomalie ou anomalie secondaire.

La sonde CBFβ breakapart sur la lame 4 permet d'identifier l'inversion (16)(p13;q22) et la translocation (16;16)(p13;q22).

Sur la lame 5 est appliquée la sonde LSI MLL dual color breakapart qui permet de détecter les réarrangements de ce gène et d'identifier les chromosomes partenaires. Elle a le potentiel de mettre en évidence les différents partenaires de fusion et offre donc la possibilité de trouver de nouveaux partenaires non identifiés.

La sonde LSI ETV6 dual color breakapart est utilisée sur la lame 6 pour identifier les différents réarrangements d'*ETV6*, connus et/ou nouveaux.

La sonde LSI PML/RAR α SF (*single fusion*) cible les locus *PML* en 15q22 et *RAR α* en 17q21 sur la lame 7, chacun d'une couleur différente et permet de mettre en évidence la translocation (15;17)(q22;q21) récurrente des LMAs.

La sonde LSI D20S108 cible la région 20q12 et est utilisée pour détecter les délétions 20q, anomalie unique ou secondaire ainsi que des translocations pouvant affecter cette région.

Finalement, la sonde LSI TP53/CEP17 est appliquée afin de mettre en évidence les délétions 17p.

Lame	Sonde	Longueur (Kb)	Site d'hybridation	fluorochrome
1.	Vysis D7S486/CEP7	308/Alpha satellite	7q31/7p11.1-q11.1	Spectrum Orange/ Spectrum Green
2.	Vysis LSI EGR1/ LSI D5S23,D5S721	200/450	5q31/5p15.2	Spectrum Orange/ Spectrum Green
3.	Vysis LSI ETO/ AML-1 dual color dual fusion	480/1300	8q22/21q22	Spectrum Orange/ Spectrum Green
4.	Vysis CBF β breakapart	130 et 204	16q22	Spectrum Orange et Spectrum Green
5.	Vysis LSI MLL dual color breakapart	350 et 190	11q23	Spectrum Green et Spectrum Orange
6.	Vysis ETV6 dual color breakapart	632 et 486	12p13	Spectrum Green et Spectrum Orange
7.	Vysis LSI PML/ RAR α SF	239/417	15q22-24/17q21	Spectrum Orange/ SpectrumGreen
8.	Vysis D20S108	201	20q12	Spectrum Orange
9.	Vysis TP53/CEP17	172/Alpha satellite	17p13.1/17p11.1-q11.1	Spectrum Orange/ SpectrumGreen

Tableau II: Sondes utilisées en FISH pour mettre en évidence les anomalies chromosomiques fréquentes ainsi que de nouveaux réarrangements dans les leucémies myéloïdes aiguës pédiatriques

En combinant la cytogénétique standard et la FISH, de nouveaux réarrangements chromosomiques ont été mis en évidence. Ces derniers ne seront cependant pas tous décrits dans ce mémoire. Deux réarrangements ont été sélectionnés dans le cadre de ce projet de maîtrise pour une caractérisation plus approfondie, à savoir, l'insertion (X;6) chez une paire

de jumelles, atteinte d'une LMA, et la translocation (12;13) chez 3 patients dont 2 atteints d'une LMA et le troisième d'une LLA. Ainsi, au total, 5 cas ont été étudiés. la caractérisation a débuté par la localisation des points de cassure par FISH en utilisant des BACs.

4. CARTOGRAPHIE PAR FISH DES NOUVELLES ALTÉRATIONS SÉLECTIONNÉES PAR FISH À L'AIDE DE BACs

Cette stratégie de caractérisation des points de cassures impliqués dans les réarrangements détectés a pour but de localiser les points de cassure par une série d'hybridations in situ en fluorescence (FISH). Une fois qu'une grande zone génomique d'intérêt est identifiée à partir de résultats obtenus par caryotype, elle est progressivement réduite, à l'aide de BACs marqués de fluorochromes différents, jusqu'à arriver à localiser chaque point de cassure au niveau d'un seul BAC. Le même protocole de FISH décrit ci-dessus a été utilisé.

4.1. Insertion (X;6)

Afin de confirmer l'insertion détectée sur caryotype chez deux jumelles (désignées patient 1 et patient 2), une peinture chromosomique, permettant de marquer les chromosomes entiers, a été effectuée, ciblant les chromosomes X et 6 (Cambio, Cambridge, UK). Cette technique consiste à utiliser plusieurs sondes de petites tailles spécifiques à un chromosome donné, et dont l'hybridation permet de colorer le chromosome entier. Le même protocole de FISH décrit ci-dessus a été utilisé.

Les bandes impliquées s'étendant sur plusieurs mégabases, une stratégie de gène candidat a été adoptée quand possible afin de réduire la région chromosomique qui sera ciblée pour la recherche du point de cassure. En effet, la bande Xp11.2 s'étend sur plus de 11Mb, la bande 6q21 et 6q23 sur environ 9Mb chaque. Cette stratégie consiste à cibler en premier les sous-bandes contenant des gènes candidats selon leur fonction et leur rôle possible dans la leucémogénèse. Au niveau de la bande Xp11.2, la sous-bande Xp11.23 était une région

candidate car elle contient plusieurs gènes impliqués dans différents cancers dont *TFE3*, *GATA1* and *HDAC6* (Mizuki, Fenski et al. 2000; Boyault, Sadoul et al. 2007; Shimizu, Engel et al. 2008). Sur la bande 6q23, un intérêt était suscité par la sous-bande 6q23.3 du fait de la présence du gène *MYB*, réarrangé dans certains cas de LLA-T et surexprimé dans certains types de tumeurs solides (Clappier, Cuccuini et al. 2007; Ramsay and Gonda 2008). Ainsi des BACs spécifiques à ces sous-bandes ont été choisis. Aucun gène candidat n'a été ciblé pour la bande 6q21 et plusieurs BACs couvrant différentes parties de cette bande ont été sélectionnés.

Les différentes sondes employées pour caractériser les points de cassure impliqués dans l'insertion (X;6), en précisant leur position (chromosome, bras chromosomique, bande chromosomique), et les fluorochromes avec lesquels elles sont marquées, sont résumées dans le tableau III. Les BACs ont été sélectionnés à partir du site <http://genome.ucsc.edu/> et commandé au centre de génomique appliquée (TCAG Genome Resource Facility , Toronto, ON, Canada). La seule sonde commerciale utilisée est la sonde LSI MYB de Vysis (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA).

Bande chromosomique	Sonde	Fluorochrome
Xp11.23	RP11-1137J13	Spectrum green
	RP11-416B14	Spectrum green
	RP11-1037C20	Spectrum orange
6q21	RP11-428F8	Spectrum orange
	RP11-622I4	Spectrum green
	RP11-341J6	Spectrum orange
	RP11-75C8	Spectrum green
	RP11-598H4	Spectrum green
	RP11-28L24	Spectrum orange
	RP11-506B6	Spectrum green
6q23.3	LSI MYB	Spectrum aqua
	RP11-557H15	Spectrum green
	RP11-104D9	Spectrum orange
	RP11-323N12	Spectrum green
	RP11-141K5	Spectrum orange

Tableau III: Sondes utilisées dans la caractérisation des points de cassures de l'insertion (X;6) des patients 1 et 2

4.2. Translocation (12;13)

Les différentes sondes employées pour caractériser les points de cassure des trois cas de translocations (12;13) chez les patients désignés respectivement patient 3,4 et 5, en précisant leur position (chromosome et bande chromosomique) et leurs fluorochromes sont résumés dans le tableau IV. Certains ont été sélectionnés à partir du site <http://genome.ucsc.edu/> alors que d'autres sont des sondes commerciales de Vysis (Abbott Molecular, Des Plaines, Il, USA) et de Poséidon (Kreatech Diagnostics, Amesterdam, the Netherlands).

Patient	Bande chromosomique	Sonde	Fluorochrome
3	12p13	Vysis LSI ETV6 dual color breakapart	Spectrum Green et Spectrum Orange
	13q12	RP11-136G6	Spectrum Green
4	12p13	Vysis LSI ETV6 dual color breakapart	Spectrum Green et Spectrum Orange
	13q14	Vysis LSI FKHR dual color breakapart	Spectrum Green et Spectrum Orange
		Vysis LSI (13) RB1	Spectrum Orange
		Vysis LSI D13S25	Spectrum Orange
		Vysis Aneuvysion LSI 13/21	Spectrum Green/Spectrum Orange
Poseidon DLEU/13qter	Spectrum Orange / Spectrum Green		
5	12p13	Vysis LSI ETV6 dual color breakapart	Spectrum Green et Spectrum Orange
	13q14	Vysis LSI FKHR dual color breakapart	Spectrum Green et Spectrum Orange

Tableau IV: Sondes utilisées pour la caractérisation des points de cassure impliqués dans les cas de translocation (12;13) des patients 3,4 et 5.

L'étude a été poursuivie au delà de la caractérisation des points de cassure par FISH pour les patients 1 et 2 afin d'évaluer les niveaux d'expression de certains gènes identifiés.

5. ÉTUDE DE L'ALTÉRATION D'EXPRESSION DES GÈNES RÉARRANGÉS CHEZ LES PATIENTS 1 ET 2 PAR RT-qPCR

Les niveaux d'expression de certains gènes candidats dans les cellules leucémiques des patients 1 et 2 ont été évalués par RT-qPCR. Faute de temps, l'étude d'expression des gènes candidats n'a pas été réalisée chez les patients 3,4 et 5. La RT-qPCR est une technique permettant d'amplifier et simultanément quantifier l'expression de gènes cibles. Suite à l'extraction de l'ARN de l'échantillon de moelle osseuse, la transcription reverse permet d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN. Ceci est suivi par une amplification de cet ADNc par PCR et une détection et quantification en temps réel. La technique a été réalisée sur les 2 échantillons, en parallèle à un contrôle normal. Les niveaux d'expression des gènes ont été évalués relativement à leurs niveaux d'expression dans les cellules de moelles normales et normalisés par rapport à l'expression du gène *housekeeping GAPDH*.

5.1. Extraction de l'ARN

Un échantillon de moelle osseuse a été obtenu lors du diagnostic. Les cellules blanches ont été récoltées suite à une lyse RBC (Gentra) et l'ARN a été extraite sur ces cellules. L'extraction a été faite à l'aide du Kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA cat n° RTN10).

En résumé, les étapes suivies sont les suivantes :

- Lyse des cellules par ajout d'une solution de guanidine thiocyanate and 2-mercaptoéthanol afin de libérer l'ARN et d'inactiver les RNAses.
- Filtration du lysat sur colonne pour enlever les débris cellulaires et fragmenter l'ADN.
- Ajout d'éthanol 70% au lysat contenant l'ARN et transfert du mix lysat/éthanol dans une colonne de fixation ayant une grande affinité pour l'ARN total.

- Lavage par 3 ajouts de différentes solutions de lavage séparés par une étape de centrifugation.
- Éluion de l'ARN par ajout d'une solution d'éluion fournie.

La mesure de la concentration de l'ARN a été faite à l'aide d'un nanodrop spectrophotomètre (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). La qualité de l'ARN a été vérifiée sur Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Canada Inc. Mississauga, ON, Canada).

5.2. RT-PCR en temps réel

5.2.1. Transcription inverse

La transcription inverse est accomplie en utilisant l'enzyme M-MLV Reverse Transcriptase d'Invitrogen (Burlington, ON, Canada cat. n° 28025-013) afin d'obtenir l'ADNc à partir de l'ARN totale.

En résumé, les ARNs ont été soumis à une transcription inverse à 37°C pendant 50 minutes dans une réaction de 20µl contenant 500ng d'ARN total, 0.5 mM de chaque dNTPs, 500ng d'oligo dT (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc, Canada), 10mM de DTT (dithiothreitol), 50mM de TRIS-HCl pH8.3, 75mM de KCl, 3mM de MgCl₂, 40U de RNase Inhibiteur (Roche, Laval, Qc, Canada) et 200U de transcriptase inverse MMLV (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

L'ADN complémentaire ainsi obtenue est dilué 5 fois avant d'être utilisé dans le PCR.

5.2.2. Choix des amorces

Les amorces, résumées dans le tableau V, ont été choisies à l'aide du site Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) en essayant d'obtenir une taille d'amplicons comprise entre 75 et 200 paires de base (pb) afin d'obtenir une amplification optimale. Nous avons aussi opté de concevoir quand cela était possible une des amorces chevauchant 2 exons

consécutifs du gène cible pour s'assurer que seul l'ADN complémentaire soit amplifié. Les amorces ont été commandées chez Invitrogen (Burlington, ON, Canada).

Gène	Amorce	Position	Taille de l'amplicon (pb)
<i>GATA1</i>	F : 5' AGGCCACTACCTATGCAACG 3'	exon 4	94
	R : 5' ACTGACAATCAGGCGCTTCT 3'	exon 4-5	
<i>HDAC6</i>	F : 5' CTGAGGGTTATGCCACCT 3'	exon 23	112
	R : 5' GCAGCCATGGACTCTGAGAT 3'	exon 23-24	
<i>MYB</i>	F : 5' GCACCAGCATCAGAAGATGA 3'	exon 14	132
	R : 5' CTGCTCCTCCATCTTTCCAC 3'	exon 14-15	
<i>GAPDH</i>	F : 5' GATCATCAGCAATGCCTCCT 3'	Exon 6-7	97
	R : 5' TGTGGTCATGAGTAATTCCA 3'	Exon 7-8	

Tableau V: Séquences des amorces utilisées dans les réactions de RT-qPCR chez les patients 1 et 2

F : *forward* (amorce gauche), R : *reverse* (amorce droite).

5.3. Amplification par PCR quantitatif en temps réel

L'amplification de l'ADNc a été détectée à l'aide de l'appareil de détection ABI PRISM 7000 (PE Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) dans une réaction de 25µl contenant 0.25 µl de l'ADNc, 1X PCR master mix SYBR Green (PE Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, Canada) et 0.2 mM de chaque amorces. Les paramètres du PCR sont : 1 cycle à 95°C 10 minutes, suivi de 40 cycles à 95°C 15 secondes et à 60 °C 1 minute. Le gène de référence utilisé est *GAPDH* : les valeurs d'expression des gènes sont rapportées à l'expression de *GAPDH* selon la formule $2^{\Delta\Delta CT}$ (Applied Biosystems User Bulletin No.2, P/N 4303859) (Livak and Schmittgen 2001). Chaque PCR a été fait en triplicata.

- * Le SYBR Green I se lie à l'ADN double brin présent dans l'échantillon. Ainsi, durant l'amplification de l'ADNc par la polymérase, ce fluorochrome se lie aux amplicons à chaque cycle. Il en résulte une augmentation de la fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN produite. En effet, la réaction de PCR en temps réel est caractérisée par un point dans le temps où l'amplification de la cible est détectée pour la première fois. Cette valeur est appelée C_t ou "cycle threshold".

CHAPITRE III : RÉSULTATS

1. DÉTECTION D'ANOMALIES CHROMOSOMIQUES PAR CYTOGÉNÉTIQUE STANDARD ET FISH

La stratégie de détection d'anomalies chromosomiques combinant la cytogénétique standard et la FISH a permis de mettre en évidence de nouveaux réarrangements chromosomiques dont la caractérisation pourrait apporter de nouvelles connaissances dans le domaine et pourrait amener à développer de nouveaux outils cliniques et thérapeutiques. Les résultats obtenus font l'objet d'une étude plus vaste réalisée au laboratoire et ne seront pas décrits ici. Par ailleurs, deux réarrangements, à savoir l'insertion (X;6) et la translocation (12;13) ont été sélectionnés pour une caractérisation des points de cassures par FISH dans ce travail de recherche.

2. CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU RÉARRANGEMENT AVEC UNE INSERTION (X;6) CHEZ DES JUMELLES AVEC UNE LEUCÉMIE MYÉLOÏDE AIGÜE

2.1. Présentation clinique

Il s'agit d'un cas de jumelles identiques avec une LMA-M2 diagnostiquée à 7 et 10 semaines de vie respectivement. Les données cliniques et hématologiques sont résumées dans le tableau VI.

	Patient 1	Patient 2
Age au diagnostic / sexe	7 semaines/femelle	10 semaines/femelle
Symptômes physiques	fièvre, asthénie, anémie, constipation, prise de lait diminuée	fièvre, asthénie, anémie prise de lait diminuée
Hépto-splénomégalie	présente	présente
Leucémie affectant le système nerveux central au diagnostic	positive	positive

Compte de cellules blanches ($10^9/L$)	27.76	51.88
Hémoglobine (g/L)	85	95
Plaquettes	359	173

Tableau VI: Données cliniques et hématologiques des patients 1 et 2 au diagnostic.

2.2. Panel et cytogénétique standard

L'analyse de FISH avec le panel des LMAs présenté auparavant n'a révélé aucune anomalie. Cependant, L'établissement du caryotype des patients 1 et 2 sur échantillons de moelle osseuse a mis en évidence des anomalies au niveau du bras long du chromosome 6 et bras court du chromosome X. La formule chromosomique suivante a alors été postulée pour les 2 patientes : $46,XX,ins(X;6)(p11.2;q21q23)$ (Figure 11). La possibilité d'une anomalie constitutionnelle a été éliminée par établissement des caryotypes sur sang périphérique qui a révélé une formule chromosomique normale (figures non montrées).

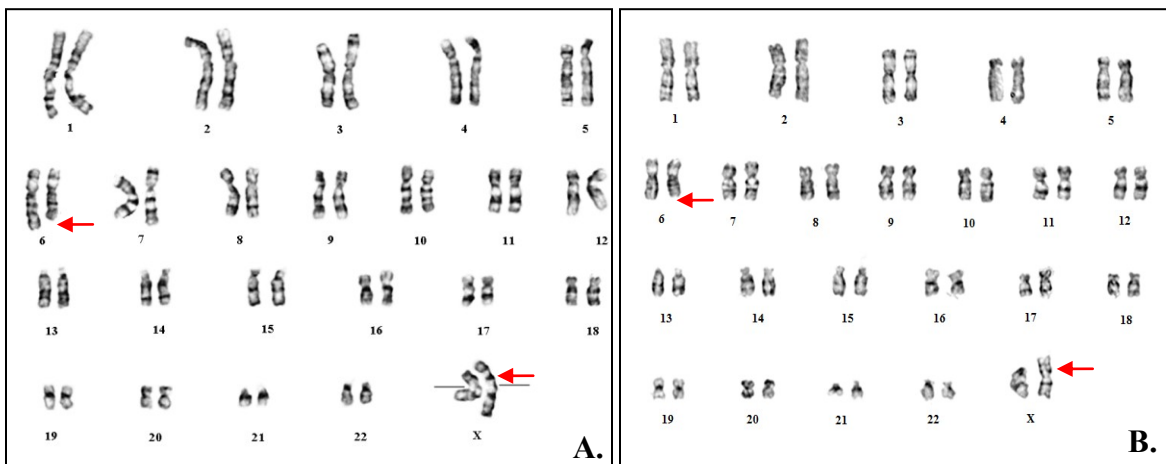


Figure 11: Caryotypes des patients 1 et 2 présentant la formule chromosomique $46,XX,ins(X;6)(p11.2;q21q23)$.

A. Caryotype en bandes G des cellules leucémiques du patient 1. **B.** Caryotype en bandes G des cellules leucémiques du patient 2. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés.

2.3. FISH

2.3.1. Peinture chromosomique

Afin de confirmer la présence de l'insertion suspectée sur caryotype, une peinture des chromosomes X et 6 a permis de confirmer la présence d'un fragment du chromosome 6 au niveau du bras court du chromosome X chez les deux patients (Figure 12).

Par la suite, différents BACs ont été utilisés afin de localiser les points de cassure au niveau des chromosomes dérivés, à savoir deux points de cassure au niveau du dérivé 6 et un point de cassure au niveau du dérivé X (Figure 13).

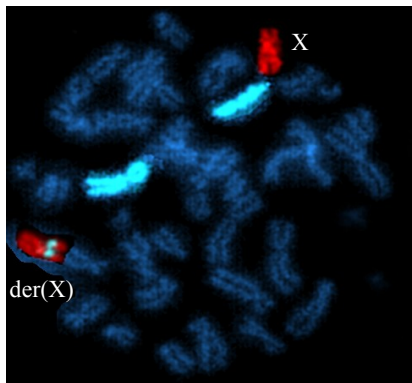


Figure 12: Peinture des chromosomes 6 et X du patient 1 sur moelle osseuse au diagnostic.

La peinture du chromosome X est en rouge et celle du chromosome 6 en bleu. Le dérivé X, portant un fragment du chromosome 6 au niveau du bras court, est indiqué. Le même résultat a été retrouvé chez le patient 2.

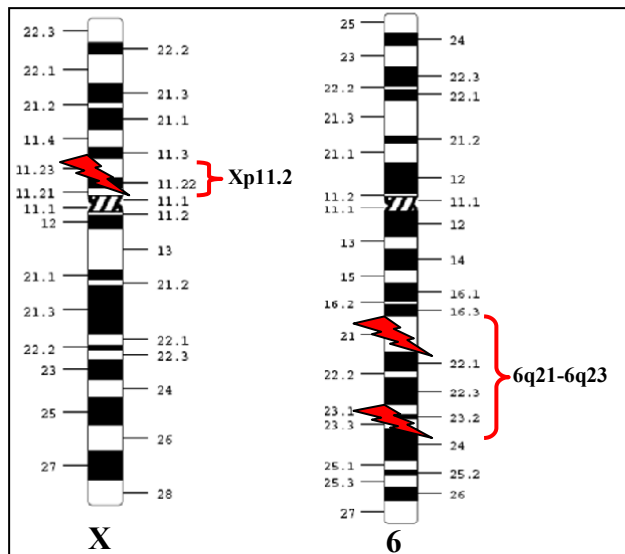


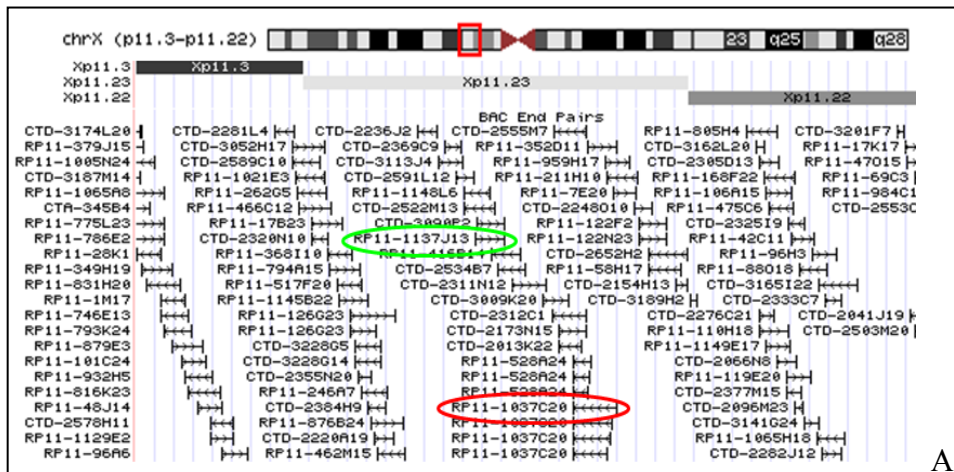
Figure 13: Idéogrammes des chromosomes X et 6

Les points de cassures à caractériser par FISH sont localisés en Xp11.2, 6q21 et 6q23 des dérivés X et 6.

2.3.2. Localisation des points de cassures impliqués dans l'insertion (X;6) par FISH

2.3.2.1. Localisation du point de cassure Xp11.2

Nous avons choisi de cibler des sous-bandes d'intérêt afin de localiser les points de cassure. L'investigation du point de cassure au niveau de la sous-bande Xp11.23 a débuté avec les BACs RP11-1137J13 (marqué en vert) et RP11-1037C20 (marqué en rouge). En parallèle, la sonde LSI MYB (marquée en bleu) en 6q23.3 (Figure 14A. et B.). Ceci a permis de localiser le point de cassure en Xp11.23 au niveau du BAC RP11-1137J13. En effet, la première hybridation a laissé suspecter une séparation du signal vert de RP11-1137J13 (Figure 14C. et D.). Une répétition de l'hybridation du BAC RP11-1137J13 uniquement a confirmé cette observation (Figure 15). Au niveau de la sous-bande 6q23.3, une séparation du signal entre les dérivés 6 et X a été obtenue, indiquant que le point de cassure 6q23.3 se trouvait au niveau de la sonde LSI MYB (Figure 14C.). Celle-ci couvrant une grande région de 740 Kb, une investigation à l'aide de BACs est nécessaire.



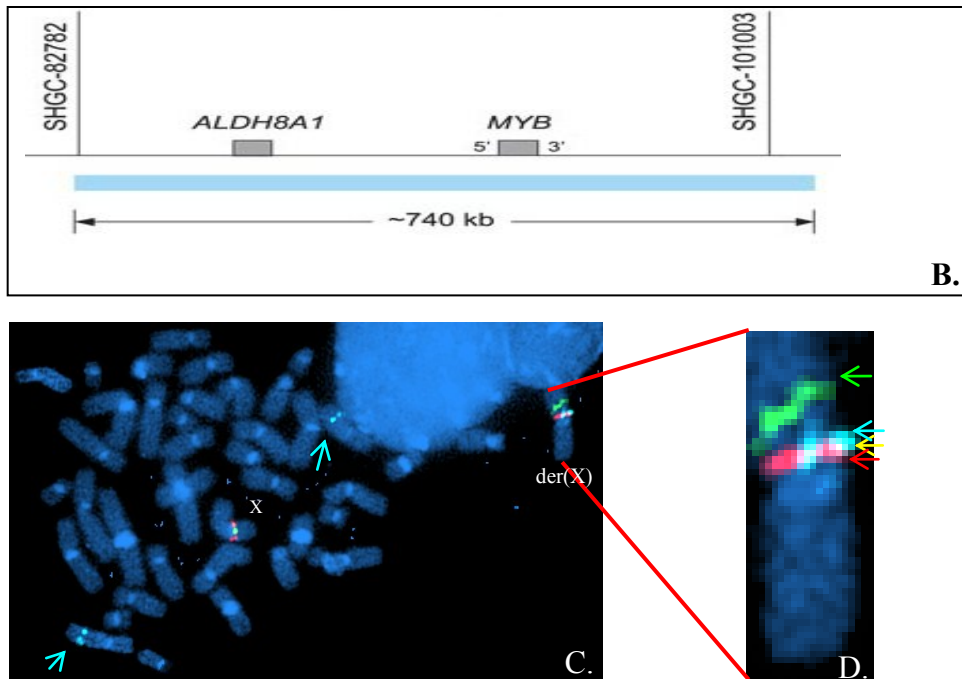


Figure 14: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-1137J13, RP11-1037C20 et la sonde LSI MYB

A. Schéma indiquant la localisation des BACs RP11-1137J13 et RP11-1037C20 utilisés dans l'investigation du point de cassure en Xp11.2. Adapté de www.genome.ucsc.edu. **B.** Représentation de la sonde Vysis LSI MYB utilisée dans l'investigation du point de cassure en 6q23. Tiré de www.abbottmolecular.com. **C.** Résultat de FISH sur mitose avec les BACs RP11-1137J13 en vert RP11-1037C20 en rouge et la sonde Vysis LSI MYB en bleu montrant un réarrangement de la région que cette dernière couvre, une partie de ce signal se trouvant sur le dérivé 6 alors que l'autre partie se trouve sur le dérivé X. **D.** Une vue en gros plan du dérivé X montre une insertion d'un fragment du dérivé 6 au niveau du BAC RP11-1137J13 à l'origine du signal jaune observé. La flèche jaune indique la présence d'un signal vert entre les signaux rouge et bleu témoignant de la séparation du bac RP11-1137J13 vert par l'insertion.

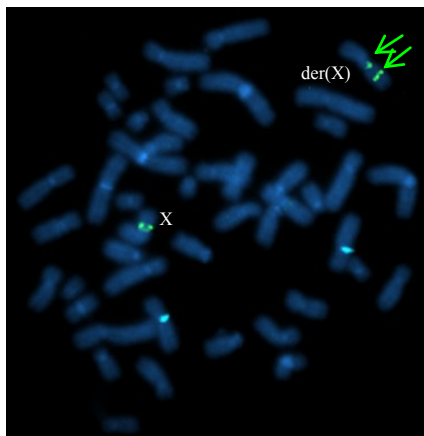


Figure 15: Analyse de FISH du patient 1 avec le BAC RP11-1137J13

FISH sur mitose avec le BAC RP11-1137J13 (vert) indiquant une séparation du signal au niveau du dérivé X. Les centromères des chromosomes 6 hybridés avec la sonde Cep 6 (Vysis) sont en bleu.

Par la suite, L'hybridation du BAC RP11-416B14, chevauchant une partie du BAC RP11-1137J13 en Xp11.23, a aussi montré une séparation de ce signal entre les dérivés X et 6, localisant ainsi le point de cassure Xp11.23 dans la région communément couverte par les BACs RP11-1137J13 et RP11-416B14. Cette région contient les gènes *GATA1* et *HDAC6* (Figures 16 et 17). Nous avons par la suite continué la caractérisation des points de cassure 6q21 et 6q23.

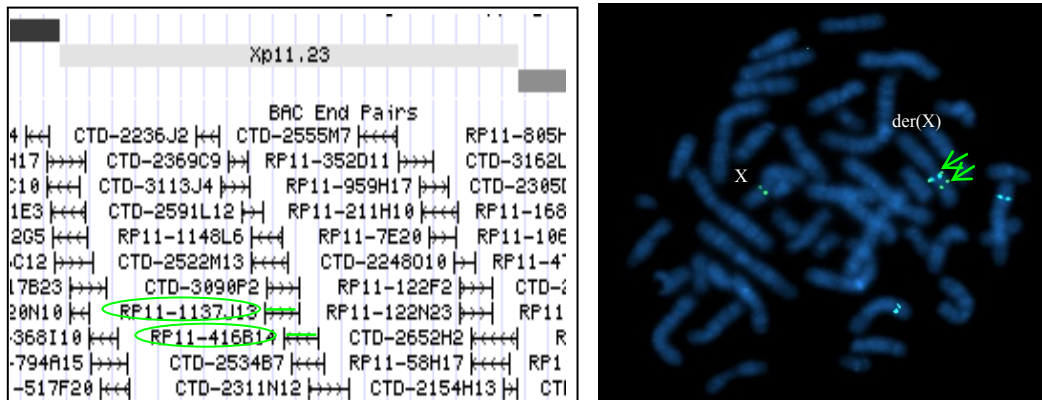


Figure 16: Analyse de FISH du patient 1 avec le BAC RP11-416B14

A. Localisation du BAC RP11-416B14 par rapport au BAC RP11-1137J13 au niveau de la sous-bande Xp11.23. Adapté de www.genome.ucsc.edu. **B.** FISH sur mitose avec le BAC RP11-416B14(vert) et la sonde LSI MYB(bleu) révélant une séparation du signal vert au niveau du dérivé X et un réarrangement de la sonde LSI MYB.

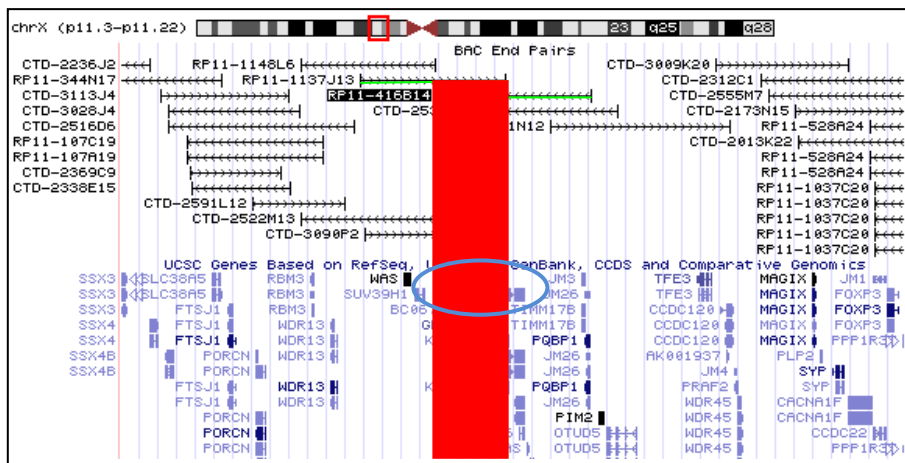


Figure 17: Localisation du point de cassure Xp11.23

Schéma indiquant la localisation du point de cassure Xp11.23 dans la région commune aux BACs RP11-1137J13 et RP11-416B14, contenant les gènes *GATA1* et *HDAC6*. Adapté de www.genome.ucsc.edu.

2.3.2.2. Localisation du point de cassure 6q23

Cette caractérisation du point de cassure en 6q23 a été faite à l'aide de BACs situés dans cette bande, tout en sachant qu'il est situé dans la région couverte par la sonde LSI MYB (Vysis). Ainsi, le BAC RP11-104D9, marqué en rouge, localisé dans cette région d'intérêt, a été hybridé avec le BAC RP11-557H15 marqué en vert, choisis à l'extérieur de la région d'intérêt comme contrôle (Figure 18A.). Cette hybridation a démontré que le point de cassure était télomérique à RP11-104D9 (Figure 18B.). Ceci signifie que le point de cassure se trouve dans la région couverte par la sonde LSI MYB télomérique à RP11-104D9. L'hybridation du BAC RP11-141K5 a donné un signal sur le chromosome 6 et l'autre sur le dérivé 6 (Figure 19).

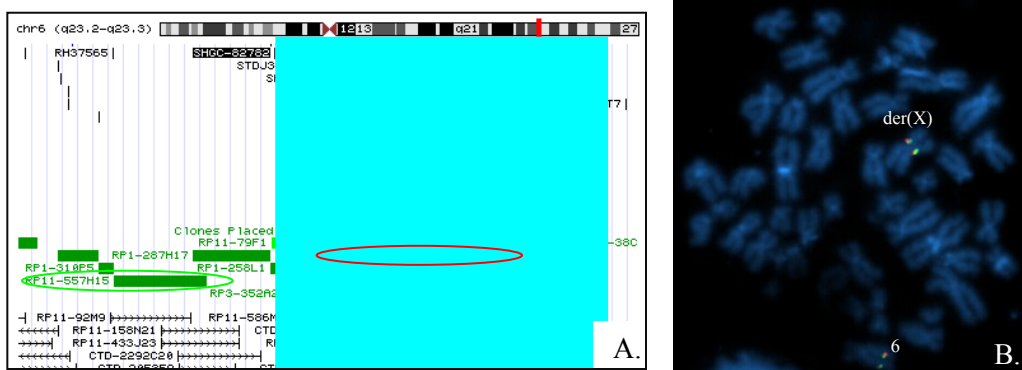


Figure 18: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-104D9 et RP11-557H15.
A. Localisation des BACs RP11-104D9 et RP11-557H15 au niveau de la sous-bande 6q23.3. La région marquée en bleu représente la région couverte par la sonde LSI MYB (Vysis). Adapté de www.genome.ucsc.edu. **B.** FISH avec les BACs RP11-104D9 (rouge) et RP11-557H15 (vert) révèle les deux signaux sur le dérivé X, ce qui signifie que le point de cassure est télomérique à ces deux BACs.

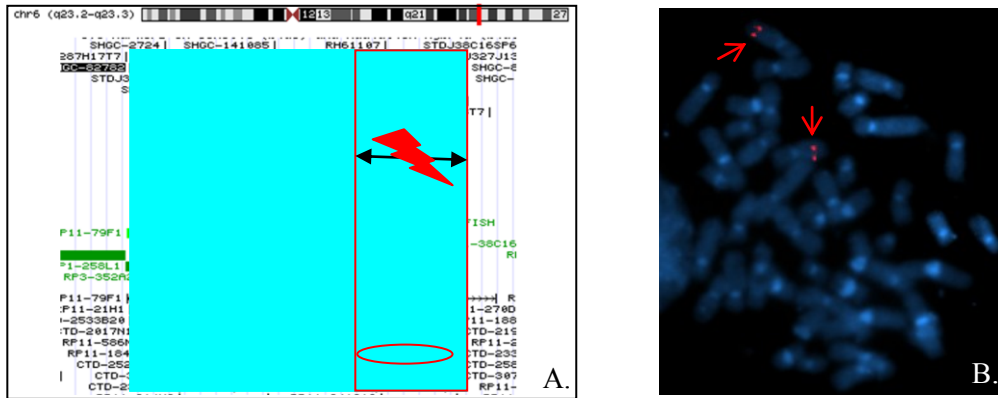


Figure 19: Analyse de FISH du patient 1 avec le BAC RP11-141K5.

A. Localisation de RP11-141K5 en 6q23.3. La zone marquée en bleu représente la région couverte par la sonde LSI MYB (Vysis). L'encadré rouge représente la partie où se trouve le point de cassure 6q23.3. Adapté de www.genome.ucsc.edu. B. FISH avec le BAC RP11-141K5 (rouge) montre les signaux sur le chromosome 6 et le dérivé 6 ce qui signifie que le point de cassure est télomérique à ce BAC.

Pour récapituler, le BAC RP11-104D9 a hybridé sur le dérivé X et le BAC RP11-141K5 sur le dérivé 6. Ceci signifie que le point de cassure en 6q23.3 se trouve entre ces deux BACs, dans une région d'environ 13Kb en aval du gène *MYB* (Figure 20A.). Cette observation a été confirmée par l'hybridation du BAC RP11-323N12 ayant donné une séparation de signal (Figure 20B.).

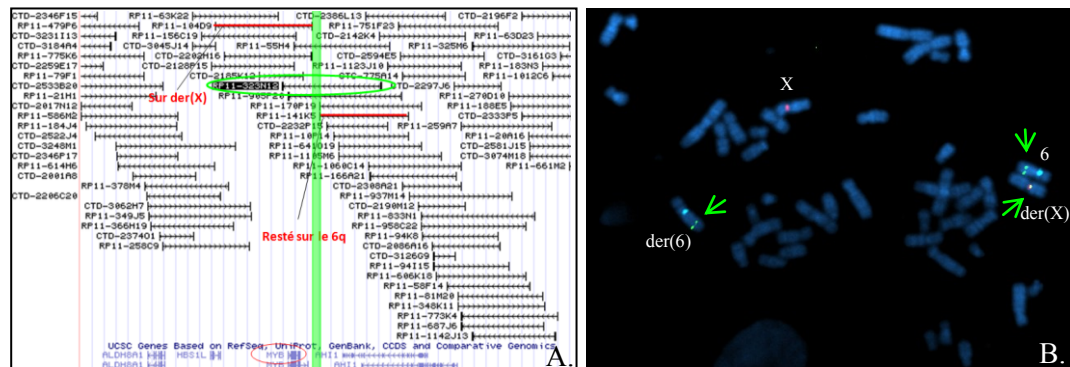


Figure 20: Analyse de FISH du patient 1 avec le BAC RP11-323N12.

A. Localisation du point de cassure 6q23.3 entre le BAC RP11-104D9 et RP11-141K5. L'encadré vert représente cette région en aval du gène *MYB*. Adapté de www.genome.ucsc.edu. B. FISH avec le BAC RP11-323N12 (vert), la sonde Cep X marquant le centromère du chromosome X (rouge), et la sonde Cep 6 marquant le centromère du chromosome 6 (bleu) montre 3 signaux verts dont un sur le dérivé X, indiquant que le point de cassure en 6q23.3 se trouve au niveau de ce BAC.

2.3.2.3. Localisation du point de cassure 6q21

Afin de localiser le point de cassure en 6q21 impliqué dans l'insertion, deux BACs couvrant différentes régions de la bande ont été choisis: RP11-249L21 et RP11-506B6. Leur hybridation sur mitose a montré que le BAC RP11-249L21 est resté sur le dérivé 6 alors que le BAC RP11-506B6 s'est retrouvé sur le dérivé X. Ceci signifie que le point de cassure se trouve entre ces deux BACs (Figure 21).

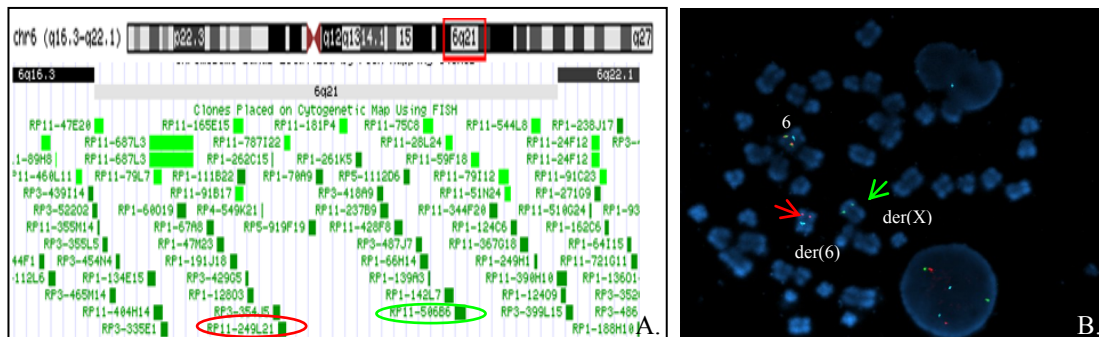


Figure 21: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-249L21 et RP11-506B6
A. Localisation des BACs RP11-249L21 et RP11-506B6 au niveau de la bande 6q21. Adapté de www.genome.ucsc.edu. **B.** FISH avec les BACs RP11-249L21 (rouge) et RP11-506B6 (vert) et la sonde Cep 6 marquant le centromère du chromosome 6 (Vysis) (bleu) montrant que le signal rouge a hybridé sur le dérivé 6 alors que le signal vert sur le dérivé X ce qui signifie que le point de cassure se trouve entre les 2 BACs utilisés.

L'hybridation des BACs RP11-428F8 et RP11-506B6 a montré que le point de cassure se situait entre ces deux BACs car le signal de RP11-428F8 s'est retrouvé sur le dérivé 6 alors que le signal de RP11-506B6 s'est retrouvé sur le dérivé X (Figure 22).

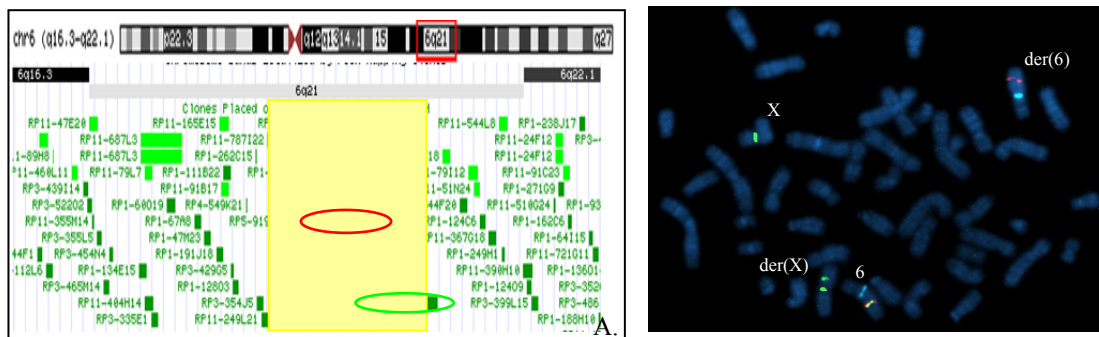


Figure 22: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-428F8 et RP11-506B6

A. Localisation des BACs RP11-428F8 et RP11-506B6 dans la région du point de cassure 6q21 indiquée par l'encadré jaune. Adapté de www.genome.ucsc.edu. **B.** L'hybridation des BACs RP11-428F8 (rouge) et RP11-506B6 (vert) avec les sondes centromériques CepX (vert) et Cep 6 (bleu) montre que le signal rouge est resté sur le dérivé 6 alors que le signal vert du BAC RP11-506B6 a hybridé sur le dérivé X, indiquant que le point de cassure se trouve entre ces 2 BACs.

L'hybridation des BACs RP11-341J6 et RP11-622I4 a montré les signaux des deux BACs sur le dérivé 6, ce qui signifie que le point de cassure est télomérique (Figure 23). Ceci veut dire que le point de cassure 6q21 se trouve entre RP11-341J6 et RP11-506B6.

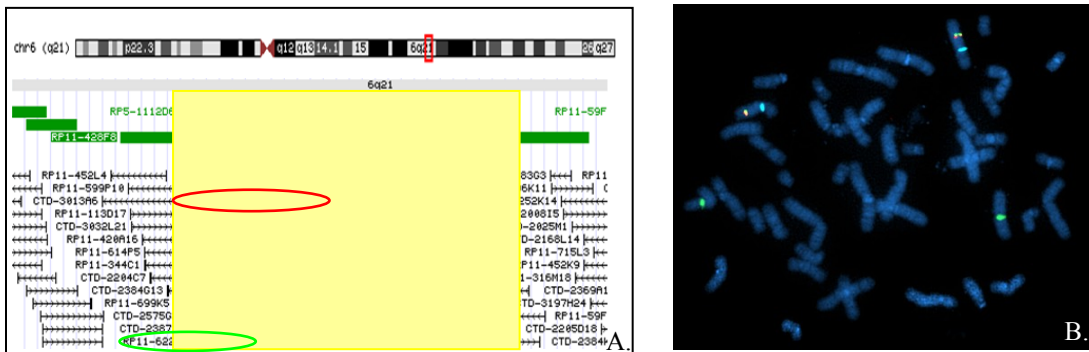


Figure 23: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-622I4 et RP11-341J6

A. Localisation des BACs RP11-622I4 et RP11-341J6 dans la zone de point de cassure 6q21 marquée par l'encadré jaune. Adapté de www.genome.ucsc.edu. **B.** FISH avec les BACs RP11-622I4 (vert) et RP11-341J6 (rouge) et les sondes centromériques Cep X (vert) et Cep 6 (bleu) montre que les signaux des BACs ont hybridés sur le dérivé 6 ce qui signifie que le point de cassure est télomérique.

L'hybridation des BACs RP11-75C8 et RP11-28L24 a révélé une séparation des signaux, indiquant que le point de cassure se trouve entre les 2 BACs (Figure 24).



Figure 24: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-75C8 et RP11-28L24

A. Localisation des BACs RP11-75C8 et RP11-28L24 au niveau de la bande 6q21, entre les BACs RP11-341J6 et RP11-506B6. Adapté de www.genome.ucsc.edu. **B.** FISH avec les BACs RP11-75C8 (vert) et RP11-28L24 (rouge) avec la sonde centromérique Cep 6 (Vysis) (bleu) montre une

séparation des signaux, le signal rouge hybridant au niveau du dérivé X et le signal vert au niveau du dérivé X, ce qui indique que le point de cassure se situe entre les 2 BACs.

Finalement, l'hybridation des BACs RP11-28L24 et RP11-598H4 a révélé une séparation du signal RP11-598H4, signifiant que le point de cassure se trouve au niveau de ce BAC. La majorité de la région couverte par ce BAC ne contient pas de gènes. Le seul gène intéressant dans la région est le gène *WISP3* (Figure 25).

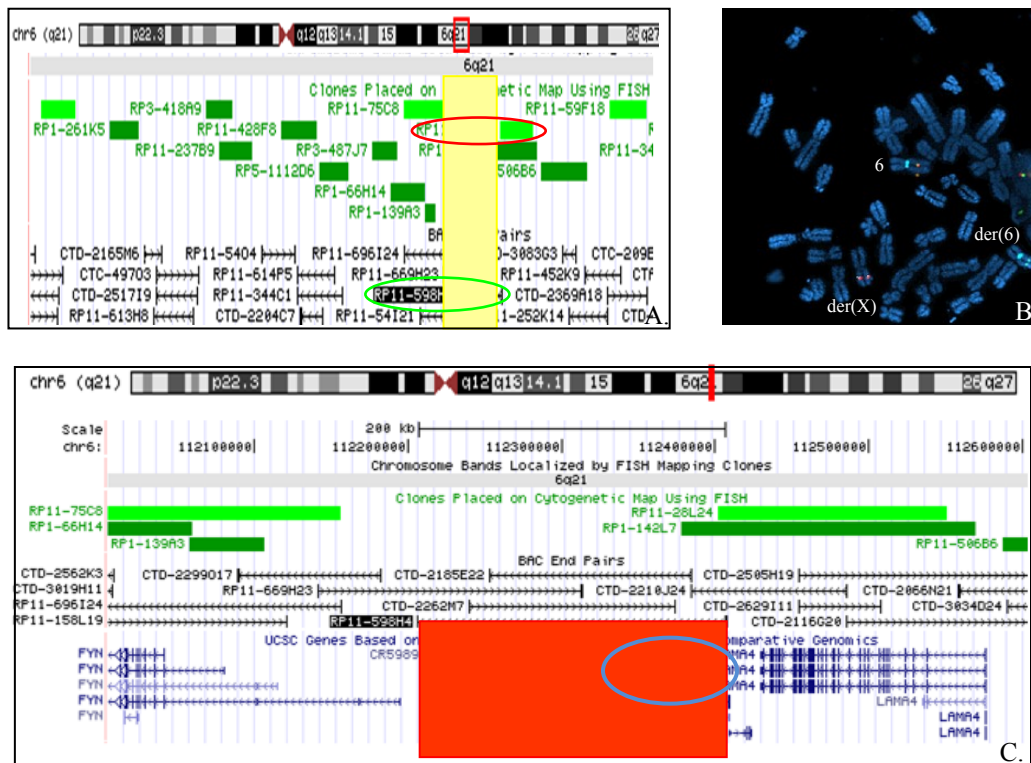


Figure 25: Analyse de FISH du patient 1 avec les BACs RP11-28L24 et RP11-598H4
A. Localisation des BACs RP11-598H4 et RP11-28L24 au niveau de la bande 6q21. L'encadré jaune indique la région où se situe le point de cassure. Adapté de www.genome.ucsc.edu. **B.** FISH avec les BACs RP11-598H4(vert), RP11-28L24(rouge) et la sonde centromérique Cep 6(Vysis) montre une séparation du signal de RP11-598H4 entre le dérivé X et le dérivé 6 ce qui signifie que le point de cassure est localisé au niveau de ce BAC. Le signal jaune au niveau du dérivé X résulte de la fusion du signal rouge de RP11-28L24 et d'une partie du signal vert de RP11-598H4. **C.** La région couverte par le BAC RP11-598H4 contient le gène *WISP3*. Adapté de www.genome.ucsc.edu.

En résumé, nous avons localisé le point de cassure Xp11.23 au niveau d'une région d'environ 80kb contenant les gènes *GATA1* et *HDAC6*. Le point de cassure 6q21 a été situé

dans une région de 200 kb approximativement contenant le gène *WISP3*. Le point de cassure 6q23.3 a été retrouvé dans une région d'environ 13Kb en aval du gène *MYB*. Nous nous sommes intéressés à étudier les conséquences de la formation du dérivé X. Plusieurs scénarios sont possibles. Le dérivé obtenu dépend en effet de la localisation du point des points de cassure Xp11.23 et 6q21 par rapport aux gènes impliqués (Xp11.23 en amont, en aval, ou au niveau du gène *GATA1* et le point de cassure 6q21 en amont, en aval ou au niveau de *WISP3*). Pour commencer à élucider les dérégulations de l'expression des gènes impliqués, nous avons choisi de pousser l'investigation en étudiant l'expression des gènes *MYB*, *GATA1* et *HDAC6* par RT-qPCR.

2.4. RT-qPCR pour l'étude d'expression des gènes *MYB*, *GATA1* et *HDAC6* chez les patients 1 et 2

L'étude d'expression quantitative des gènes *MYB*, *GATA1* et *HDAC6* a donné des pourcentages d'expression résumés dans le tableau VII.

GÈNE	PATIENT 1 (%)	PATIENT 2 (%)
<i>MYB</i>	134.41244	181.923679
<i>GATA1</i>	17.2340459	20.6851406
<i>HDAC6</i>	367.225608	292.141369

Tableau VII: Pourcentage d'expression des gènes *MYB*, *GATA1* et *HDAC6* par RT-qPCR des patients 1 et 2 par rapport à un contrôle normal.

L'expression du contrôle normal est fixée à 100%.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression des gènes *MYB* et *HDAC6* et une diminution de l'expression de *GATA1* chez les deux patients.

3. CARACTERISATION DE TROIS CAS DE TRANSLOCATION (12 ;13) PAR FISH

3.1. Patient 3 portant une translocation (12 ;13)

3.1.1. Présentation clinique

Le premier cas de translocation (12;13) est celui d'un enfant atteint d'une LMA. Aucune autre donnée clinique ou hématologique n'est disponible.

3.1.2. Panel et cytogénétique standard

Ce cas datant de 2005, le panel présenté auparavant n'avait pas été appliqué. Cependant, les sondes TEL-AML1 dual color ES et LSI 13(RB1) (Vysis) avaient été appliquées et avaient démontré un réarrangement de *ETV6 (TEL)* avec une délétion de l'allèle réarrangé. L'établissement du caryotype du patient 3 sur cellules de moelle osseuse du diagnostic a mis en évidence des dérivés 12 et 13. La formule chromosomique suivante a alors été postulée: 46,XY,t(12;13)(p13;q?12). Le point de cassure en 13q était difficile à déterminer à cause de la faible résolution des chromosomes (Figure 26).

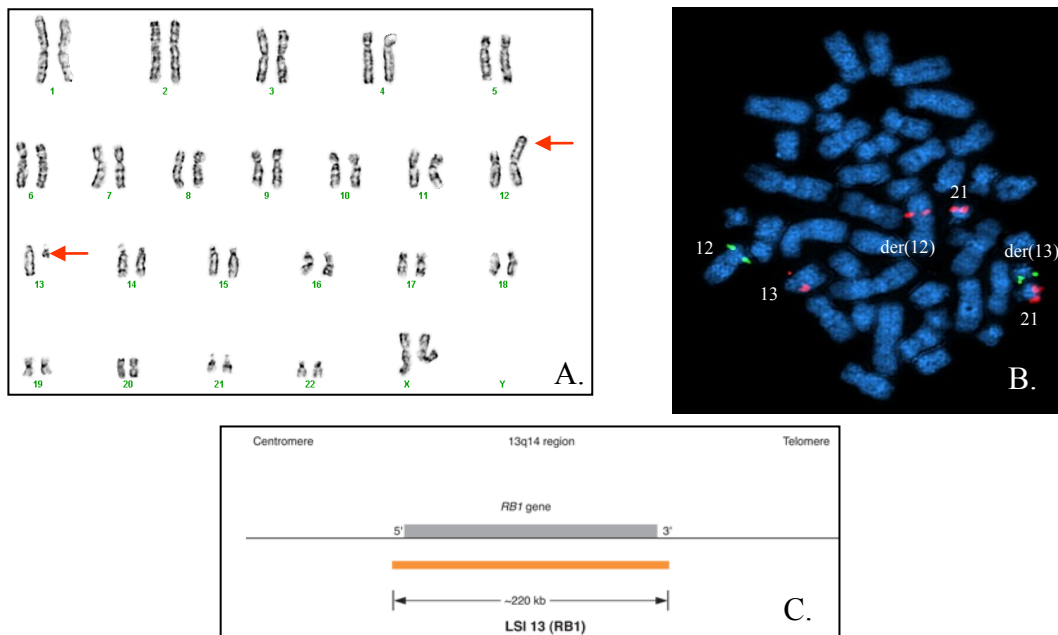


Figure 26: Caryotype et FISH du patient 3 présentant la formule chromosomique 46,XX,t(12 ;13)(p13 ;q ?12)

A. Caryotype en bandes G des cellules leucémiques du patient 3. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés. **B.** FISH avec la sonde TEL-AML1 dual color ES (TEL :vert et AML1: rouge) et la sonde LSI 13(RB1) (rouge) montre une séparation du signal de TEL (ETV6) entre les dérivés 12 et 13 avec une délétion de l'allèle réarrangé. Le locus RB1 est intact. **C.** Sonde LSI 13 (RB1) de Vysis. Tiré de www.abbottmolecular.com

3.1.3. Localisation du point de cassure 13q du patient 3 par FISH

Afin de localiser le point de cassure au niveau du dérivé 13, suspecté en 13q12 sur le caryotype, le BAC RP11-136G6 a été appliqué sur mitoses. Ce BAC couvre deux gènes candidats intéressants, à savoir *FLT3* et *CDX2*. Cette analyse de FISH a permis de mettre en évidence une séparation du signal de ce BAC entre le dérivé 12 et le dérivé 13 ce qui signifie que le point de cassure se situe au niveau de ce BAC en 13q12.2 (Figure 27). Ceci ne permet cependant pas de déterminer lequel des deux gènes couverts par ce BAC est impliqué dans la translocation.

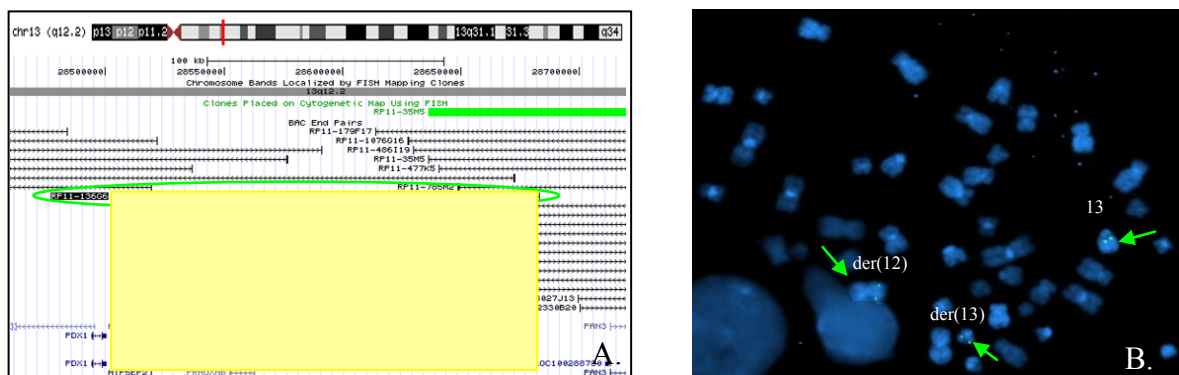


Figure 27: Analyse de FISH du patient 3 avec le BAC RP11-136G6

A. Localisation du BAC RP11-136G6 au niveau de la sous-bande 13q12.2. Adapté de www.genome.ucsc.edu. **B.** FISH avec le BAC RP11-136G6 (vert) montre une séparation du signal vert entre les dérivés 12 et 13, ce qui signifie que le point de cassure 13q se situe au niveau de ce BAC.

3.2. Patient 4 portant une translocation t(12 ;13)

3.2.1. Présentation clinique

Il s'agit d'un enfant avec une LLA. Aucune donnée clinique ou hématologique n'est disponible.

3.2.2. Panel et cytogénétique standard

L'analyse de FISH avec le panel des LLA établis a permis de mettre en évidence un réarrangement du locus d'*ETV6*, avec une délétion de l'allèle réarrangé. L'établissement du caryotype sur cellules de moelle osseuse du diagnostic de ce patient a mis en évidence des dérivés 12 et 13 et un dérivé 2 portant une délétion au niveau du bras long. La formule chromosomique suivante a alors été postulée: 46,XY,del(2)(q33),t(12;13)(p13;q?12) (Figure 28). La résolution des chromosomes ne permettait pas de définir exactement la localisation du point de cassure 13q. Une caractérisation de ce point de cassure a été alors entreprise par FISH afin de déterminer le partenaire de fusion du gène *ETV6* au niveau du dérivé 13.

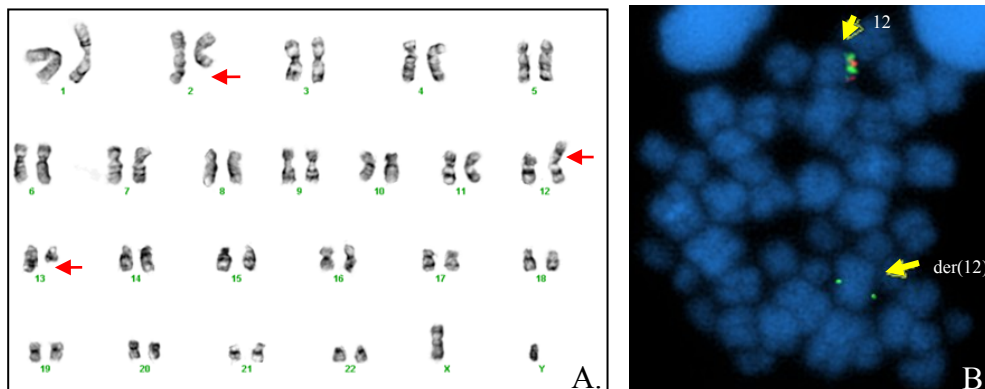


Figure 28: Caryotype et FISH du patient 4 présentant la formule chromosomique 46,XY,del(2)(q31),t(12 ;13)(p13 ;q ?12)

A. Caryotype en bandes G des cellules leucémiques du patient 3. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés. **B.** FISH avec la sonde LSI *ETV6* dual color breakapart montre une séparation du signal d'*ETV6* avec une délétion de l'allèle réarrangé.

3.2.3. Localisation du point de cassure 13q du patient 4 par FISH

L'investigation du point de cassure 13q du patient 4 a débuté avec l'hybridation du BAC RP11-136G6 couvrant les gènes *CDX2* et *FLT3*. Celle-ci a démontré que la région chromosomique ciblée par ce BAC est intacte car le signal a hybridé au niveau du dérivé 13 (Figure 29). Ceci signifie que le point de cassure est télomérique.

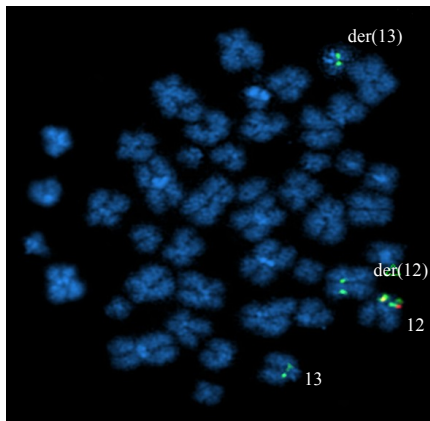


Figure 29: Analyse de FISH du patient 4 avec le BAC RP11-136G6

FISH avec le BAC RP11-136G6 (vert) et la sonde LSI ETV6 dual color breakapart montre un signal vert du BAC RP11-136G6 intacte sur chacun du chromosome 13 et du dérivé 13. La délétion de l'allèle réarrangé d'*ETV6* est aussi détectée dans cette analyse.

Une autre bande du chromosome 13 que nous avons décidé de cibler par la suite est la bande 13q14, contenant le partenaire de fusion *TTL* d'*ETV6*. À cause de sa disponibilité au laboratoire, la sonde LSI FKHR Dual color breakapart (Vysis) dont une partie couvre le gène *TTL*, a été appliquée. Celle-ci n'a montré aucun réarrangement de cette sonde ce qui signifie que le point de cassure est plus télomérique (Figure 30).

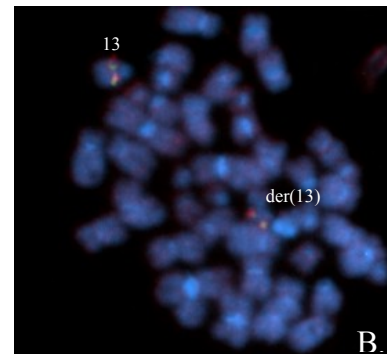
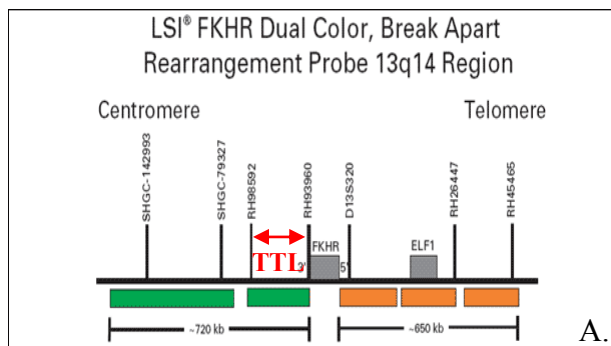


Figure 30: Analyse de FISH du patient 4 avec la sonde LSI FKHR dual color breakapart

A. Sonde LSI FKHR dual color break apart. Adapté de www.abbottmolecular.com B. FISH avec la sonde LSI FKHR dual color break apart montre un signal jaune au niveau du dérivé 13 et un autre au niveau du chromosome 13 ce qui signifie que le point de cassure 13q est plus télomérique.

Télomérique au locus *FOXO1* (*FKHR*) se trouve le locus de *RBI*. L'application de la sonde LSI 13(RB1) a donné un profil d'hybridation normal, un signal se trouvant sur le chromosome 13 et l'autre sur le dérivé 13 (Figure 31).

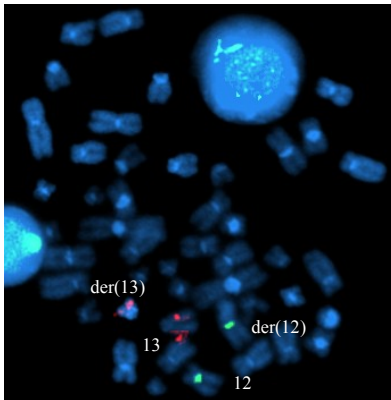


Figure 31: Analyse de FISH du patient 4 avec la sonde LSI 13(RB1)

FISH avec la sonde LSI 13 (RB1)(Vysis) en rouge et la sonde Cep 12(Vysis) en vert montre un profil d'hybridation normal ce qui signifie que le point de cassure 13q est télomérique.

La sonde LSI D13S25(Vysis) a été appliquée par la suite car elle est télomérique à LSI 13(RB1). L'hybridation de celle-ci indique qu'elle a hybridé sur le dérivé 12 (Figure 32). Ceci signifie que le point de cassure est plus centromérique.

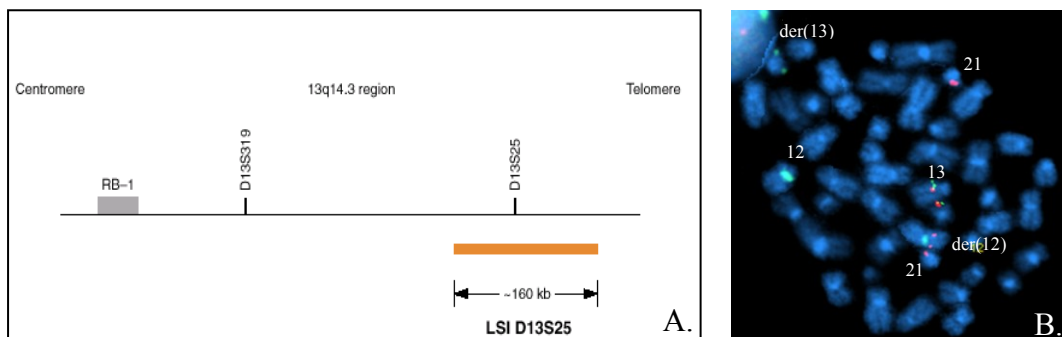


Figure 32: Analyse de FISH du patient 4 avec la sonde LSI D13S25

A. Sonde LSI D13S25. Tiré de www.abbottmolecular.com **B.** Analyse de FISH avec la sonde LSI D13S25 (rouge), hybridée en parallèle avec les sondes Aneuvysion LSI 13/21(vert/rouge) et Cep 12 (vert) (Vysis) indiquant que la sonde LSI D13S25 a hybridé sur le dérivé 12 ce qui signifie que le point de cassure au niveau du dérivé 13 est centromérique à cette sonde.

Ainsi, en combinant les résultats obtenus avec l'hybridation de la sonde LSI 13(RB1) et celle de la sonde LSI D13S25, nous concluons que le point de cassure au niveau du dérivé 13 se trouve entre ces 2 sondes. Nous avons donc appliqué la sonde Poseidon DLEU/13qter qui cible une région entre les locus *RBI* et *D13S25* et la région terminale du bras long du chromosome 13 comme contrôle. Cette hybridation a montré une délétion au niveau de la région ciblée en 13q14 (Figure 33).

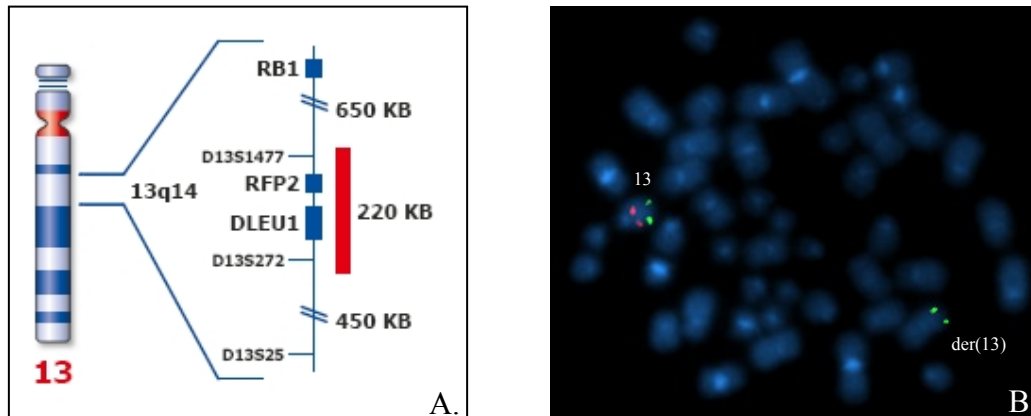


Figure 33: Analyse de FISH du patient 4 avec la sonde Poseidon DLEU/13qter
A. Sonde Poseidon DLEU/13qter. Tiré de www.kreatech.com **B.** FISH avec la sonde Poseidon DLEU/13qter ciblant une région de 220Kb en 13q14 (rouge) et la région terminale du chromosome 13 (vert) indique une délétion en 13q14.

Pour résumer les résultats de FISH du patient 4, le point de cassure 13q14 serait situé entre les locus RB1 et D13S25 avec la délétion d’une région d’au moins 220Kb contenant les gènes codant pour les microARNs mir-15a et mir-16-1 (Figure 34).

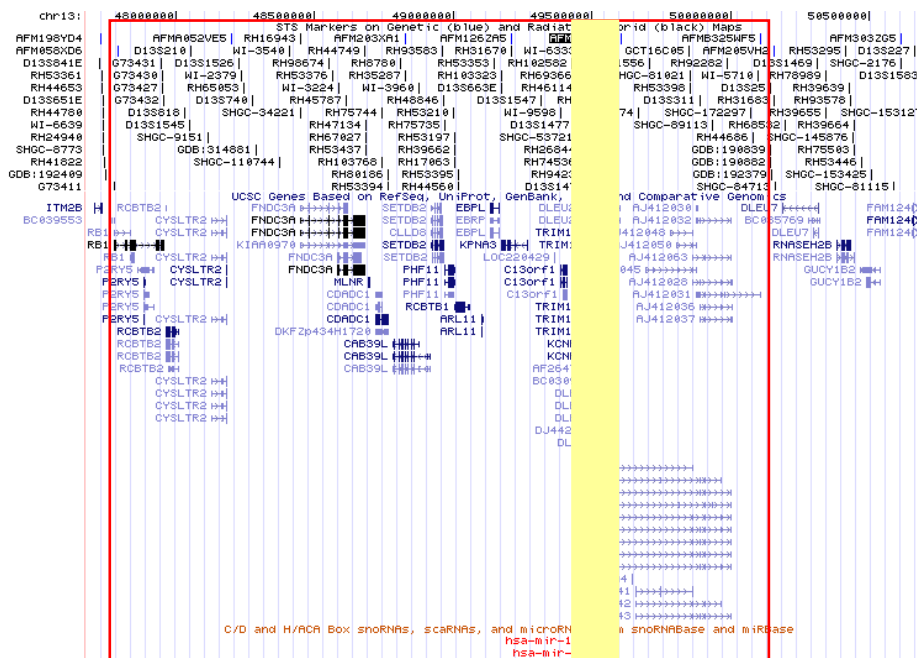


Figure 34: Figure résumant la localisation du point de cassure 13q14 du patient 4
 Le point de cassure se trouve entre le locus *RB1* et *D13S25*, avec la délétion d’une région contenant les gènes *mir-15a* et *mir-16-1*. Adapté de www.genome.ucsc.edu

3.3. Patient 5 portant une translocation (12;13)

3.3.1. Présentation clinique

Il s'agit d'un enfant avec une LMA. Aucune autre donnée clinique ou hématologique n'est disponible.

3.3.2. Panel et cytogénétique standard

L'analyse de FISH avec le panel des LMA établis a mis en évidence un réarrangement du locus d'*ETV6* dans ce qui semble être une translocation t(12;13). L'établissement du caryotype sur cellules de moelle osseuse du diagnostic de ce patient a mis en évidence des dérivés 12 et 13. La formule chromosomique suivante a alors été postulée: 46,XX,t(12;13)(p13;q?14) (Figure 35). La résolution des chromosomes ne permettant pas de définir exactement la localisation du point de cassure 13q, une caractérisation par FISH a été entreprise afin de déterminer le partenaire de fusion du gène *ETV6* au niveau du dérivé 13.

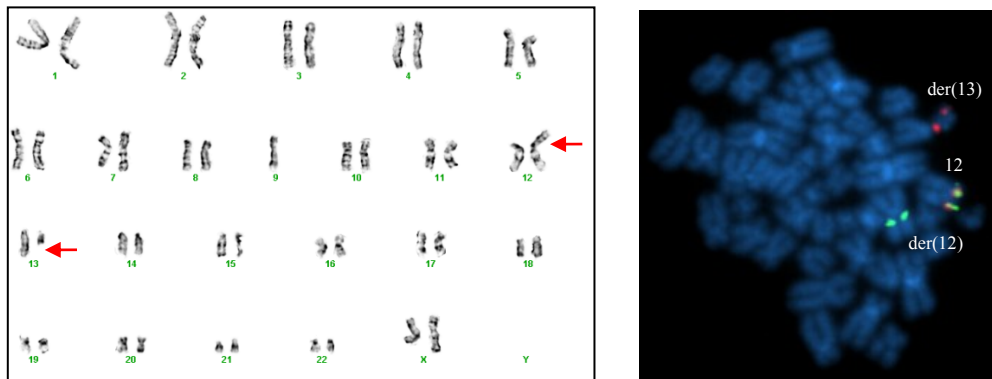


Figure 35: Caryotype et FISH du patient 5 présentant la formule chromosomique 46,XX,t(12 ;13)(p13 ;q ?14)

A. Caryotype en bandes G des cellules leucémiques du patient 5. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés. **B.** FISH avec la sonde LSI *ETV6* dual color breakapart montre un réarrangement de *ETV6* dans une translocation t(12;13).

3.3.3. Localisation du point de cassure 13q du patient 5 par FISH

Par le même raisonnement employé pour le patient 4, nous avons appliqué la sonde LSI FKHR breakapart (se référer à la figure 30A.) afin de vérifier la possibilité de l'implication

du gène *TTL* dans la translocation. L'hybridation de cette sonde a démontré un réarrangement de cette sonde, ce qui signifie que le gène *FOXO1* serait le partenaire de fusion d'*ETV6* dans cette translocation t(12 ;13) (Figure 36).

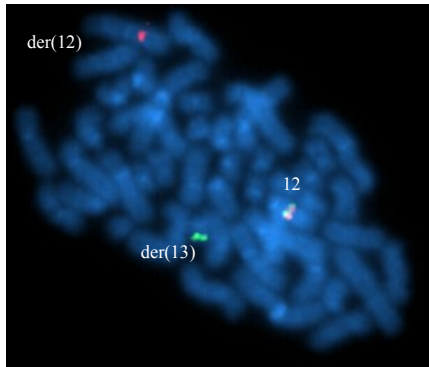


Figure 36: Analyse de FISH du patient 5 avec la sonde LSI FKHR breakapart

Cette hybridation démontre un réarrangement de *FOXO1(FKHR)*.

CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSION

La leucémie est le cancer de l'enfant le plus fréquent. Dans la population pédiatrique, la majorité des cas sont des LLAs. L'autre type de leucémie affectant l'enfant est la LMA. Le traitement de la leucémie est stratifié selon des groupes de risque, définis non seulement suivant des facteurs comme l'âge du patient, la présentation clinique et les données hématologiques mais également suivant les facteurs génétiques. Certaines anomalies génétiques associées à la leucémie sont des facteurs pronostiques puissants et sont devenues des composants essentiels pour le choix du traitement. Cependant, des échecs de traitement surviennent encore dans tous les sous-types de leucémies. La découverte de nouveaux marqueurs pronostiques pour améliorer la classification des leucémies pédiatriques et leur traitement d'une part, et la mise en évidence de nouvelles voies de leucémogénèse d'autre part, est donc un défi majeur en oncologie pédiatrique.

À cette fin, des panels de FISH spécifiques aux LLAs et LMAs pédiatriques, visant à détecter les anomalies chromosomiques les plus fréquentes et/ou à valeur pronostique, ont été établis. Ils ciblent les gènes les plus fréquemment réarrangés dans chaque type de leucémie. De plus, la combinaison du panel de FISH et du caryotype permet de dépister des anomalies rares et/ou non caractérisées. Cette stratégie a permis de mettre en évidence de nouveaux réarrangements non rapportés, des anomalies rares et de nouveaux partenaires connus comme étant impliqués dans des gènes fusions des leucémies. Parmi ceux là, deux réarrangements ont été sélectionnés pour une caractérisation plus approfondie : l'insertion (X ;6) et la translocation (12 ;13).

L'INSERTION (X;6)

Le premier réarrangement étudié est une insertion (X;6) chez des jumelles atteintes d'une LMA-M2. Le fait que le même réarrangement rare se retrouve chez les jumelles monozygotes et le jeune âge d'apparition témoignent de l'origine prénatale probable de leur leucémie. En 2009, des évidences d'une transmission maternelle *in utero* de cellules cancéreuses ont été publiées. La mère a été diagnostiquée avec une LLA associée à une fusion *BCR-ABL1* et son enfant développa, à l'âge de 11 mois, un lymphome dans la joue

associé à une fusion *BCR-ABL1*. Le séquençage du point de fusion des cellules cancéreuses de la mère et de l'enfant révéla la même séquence de fusion. Cette même fusion était présente dans des gouttes de sang néonatal archivées. Ceci prouve que le clone cancéreux a été transmis de la mère à l'enfant et était présent chez l'enfant à la naissance. Dans le cas présent, la mère est en bonne santé et il ne semble donc pas y avoir de transmission maternelle du clone leucémique (Isoda, Ford et al. 2009). Par ailleurs, une revue de la littérature a montré qu'aucun cas de leucémie avec une insertion (X;6) comme anomalie unique n'a auparavant été rapporté. 4 cas de LMA avec une translocation (X;6) impliquant les mêmes points de cassure sont cependant rapportés. Un premier article en 1997 rapportait deux cas de t(X;6)(p11;q23) associés à une leucémie aiguë basophile, le premier impliquant un enfant de 2.5 mois et le second affectant un enfant de 6 mois, sans aucune caractérisation moléculaire (Dastugue, Duchayne et al. 1997). Un troisième cas, décrit dans le cadre d'une grande étude sur les leucémies aiguës pédiatriques, concerne un enfant de 17 mois avec une LMA (Chessells, Harrison et al. 2002). Récemment, un cas de LMA portant la translocation (X;6) associée à une fusion *MYB-GATA1* chez un enfant de 6 mois a été rapporté (Belloni, Shing et al. 2011). Le cas présent pourrait donc représenter un variant de cette anomalie récurrente.

La caractérisation des points de cassure a été entreprise, afin de déterminer les gènes impliqués dans l'insertion. De multiples études par FISH ont été réalisées avec une série de sondes. Une fois les résultats analysés, les points de cassure ont été localisés au niveau de la région commune aux BACs RP11-1137J13 et RP11-416B14 en Xp11.23, au niveau du BAC RP11-598H4 en 6q21 et au niveau du BAC RP11-323N12 en 6q23.3.

Le point de cassure en Xp11.23 a été localisé dans une région de 80 Kb contenant les gènes *GATA1* et *HDAC6*. En 6q21, le point de cassure a été retrouvé dans une région de 200 kb approximativement contenant le gène *WISP3*. En 6q23.3, le point de cassure a été localisé dans une région d'environ 13kb, en aval du gène *MYB*. Suite à une translocation ou une insertion, deux chromosomes dérivés sont formés. Cependant, en général, seulement un des deux dérivés confère le potentiel oncogénique car plusieurs facteurs, dont le cadre de lecture respecté au niveau de la fusion, sont nécessaires pour que celle-ci soit fonctionnelle.

L'intérêt dans notre étude a été d'élucider les conséquences de la formation du dérivé X car les gènes importants au niveau des points de cassure en faisaient un candidat intéressant. En théorie, 6 dérivés fonctionnels sont possibles et sont schématisés dans la figure 37.

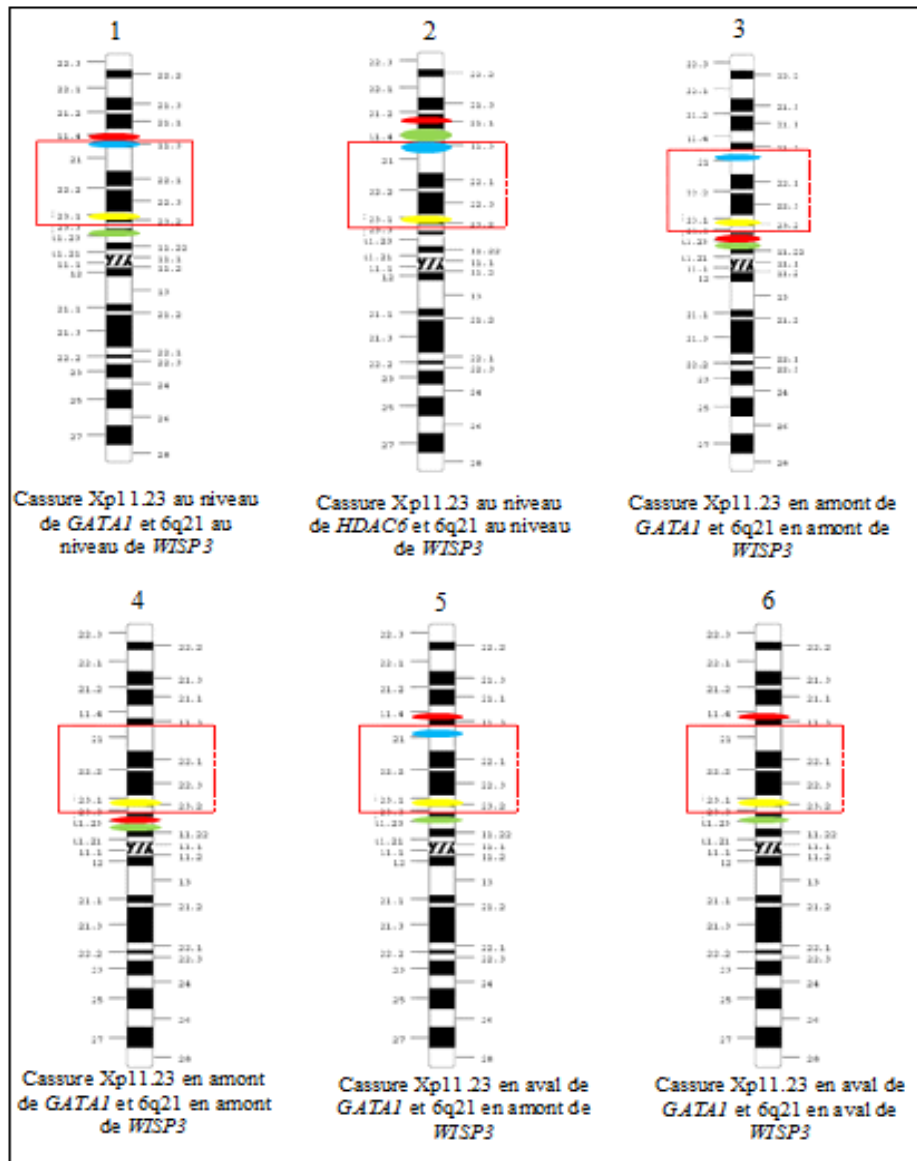


Figure 37: Différents dérivés X possibles suite à l'insertion (X;6)

Les figures ne sont pas à l'échelle et sont seulement une schématisation visuelle des différents dérivés X pouvant théoriquement être formés suite à l'insertion (X;6). L'encadré rouge représente le fragment chromosomique 6q21-6q23.3 inséré au niveau du dérivé X. le gène *GATA1* est représenté en rouge, *HDAC6* en vert, *WISP3* en bleu et *MYB* en jaune.

La possibilité 1 entraînerait la formation d'une fusion *GATA1-WISP3* et placerait l'expression de *HDAC6* sous le contrôle de *MYB*. La possibilité 2 entraînerait la fusion *HDAC6-WISP3*. Les possibilités 3 et 4 placeraient les gènes *GATA1* et *HDAC6* en aval de *MYB* et donc leur expression sous le contrôle de ce gène. La possibilité 5 placerait le gène *WISP3* en aval de *GATA1* et *HDAC6* en aval de *MYB*, dérégulant potentiellement l'expression de *WISP3* et *HDAC6*. Finalement, la possibilité 6 entraînerait le placement de *HDAC6* en aval de *MYB*. Cependant, tout cela reste hypothétique. D'autres dérivés sont possibles mais peu probables car ils entraîneraient une cassure au niveau d'un gène sans qu'il n'y ait de partenaire pour la formation d'une fusion chimérique et n'ont donc pas été représentés. Par la suite, les niveaux d'expression des gènes *MYB*, *GATA1* et *HDAC6* ont été évalués par RT-qPCR. L'analyse des résultats obtenus suggère d'une part une diminution de l'expression de *GATA1* et une augmentation de l'expression de *MYB* et *HDAC6* observées chez les 2 patients. En effet, l'expression du gène *MYB* a légèrement augmenté de 1.34 fois chez le patient 1 et 1.8 fois chez le patient 2, par rapport au contrôle normal. D'autre part, une diminution de l'expression de *GATA1* à 0.17 fois chez le patient 1 et à 0.2 fois chez le patient 2 a été observée. En ce qui concerne le gène *HDAC6*, son expression a été augmentée de 3.67 fois et 2.92 fois chez chacun des patients 1 et 2 respectivement. Les variations entre les jumelles pour l'expression d'un même gène pourrait être due à des anomalies génétiques secondaires, autre que l'insertion (X ;6), qui seraient postnatales et donc différentes chez les 2 patientes et qui affecteraient différemment l'expression des gènes étudiés. De nombreux exemples de tels cas sont rapportés dans la littérature (Wiemels, Ford et al. 1999; Maia, Koechling et al. 2004) Ces anomalies secondaires ne sont pas visibles au caryotype effectué mais seraient mise en évidence par des méthodes de haute résolution comme les micropuces.

***GATA1* (Xp11.23) :**

Vers la fin des années 1980s, plusieurs groupes ont mis en évidence le gène *GATA1*, premier membre de la famille *GATA* de facteurs de transcription (Evans, Reitman et al. 1988; Evans and Felsenfeld 1989; Tsai, Martin et al. 1989). Alors que les évidences

émergeaient sur son importance dans l'expression des gènes de la lignée érythroïde, il est aujourd'hui reconnu comme un régulateur clé du développement de plusieurs lignées hématopoïétiques (Crispino 2005). En effet, *GATA1* contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes dans plusieurs types cellulaires hématopoïétiques différenciés tels que les érythrocytes, mégacaryocytes, éosinophiles et mastocytes (Tsang, Fujiwara et al. 1998). En ce qui concerne l'activité de ce gène, des évidences suggèrent que *GATA1*, en plus d'activer des gènes cibles, réprime l'expression d'autres gènes durant la différenciation des érythrocytes (Rylski, Welch et al. 2003). Ainsi, à cause de la diminution de l'expression de ce gène mise en évidence par l'étude d'expression, les gènes cibles ne seraient pas activés ou réprimés, ce qui pourrait entraîner un arrêt de différenciation.

Ce gène contient 3 domaines fonctionnels : 2 domaines en doigt de zinc, « N-finger » et « C-finger », et un domaine d'activation N-terminal pour activer la transcription de gènes cibles (Liew, Rand et al. 2006) (Figure 38). Le domaine « N-finger » est particulièrement important car il permet non seulement de lier l'ADN mais aussi de lier des cofacteurs dont FOG-1, *friend of GATA1*. Comme *GATA1*, *FOG-1* est essentiellement exprimé dans les cellules hématopoïétiques, et est essentiel au développement des globules rouges et des mégacaryocytes (Tsang, Fujiwara et al. 1998). L'interaction de GATA1 et de FOG-1 est absolument essentielle pour le développement érythrocytaire (Crispino, Lodish et al. 1999). Des évidences suggèrent que FOG-1 a une action antagoniste à GATA1 dans certains types cellulaires (Querfurth, Schuster et al. 2000). Des interactions avec d'autres protéines, telles que RUNX1, seraient aussi essentielles à l'hématopoïèse normale (Elagib, Racke et al. 2003).

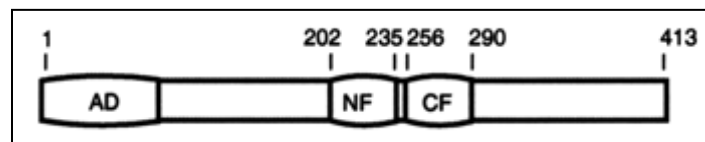


Figure 38: Structure du gène *GATA1*

Le gène *GATA1* contient 3 domaines fonctionnels : 2 domaines en doigt de zinc, « N-finger » (NF) et « C-finger » (CF) et un domaine d'activation N-terminal (AD). Les numéros indiquent les acides aminés. Tiré de Liew, 2006.

Du fait de l'importance de *GATA1* dans la maturation érythrocytaire et mégakaryocytaire, il n'existe aucune mutation entraînant une perte de fonction de ce gène. Par contre, plusieurs groupes ont rapporté des mutations familiales nonsense de *GATA1* causant une thrombocytopénie (Nichols, Crispino et al. 2000; Mehaffey, Newton et al. 2001). Celles-ci sont cependant très rares.

En plus des mutations héréditaires rares mentionnées, *GATA1* est altéré dans le syndrome myéloprolifératif transitoire (SMT) et la LMKA, un sous-type de LMA. Alors que le SMT est largement restreint aux enfants atteints du syndrome de Down, la LMKA a une forte incidence de 1/500 dans ce groupe, correspondant à un risque 500 fois plus élevé que celui d'enfants non atteints du syndrome de Down. 10% des enfants atteints du syndrome Down naissent avec le SMT mais la maladie disparaît dans la majorité des cas. Cependant, entre 20 et 30% des cas diagnostiqués se développent en LMKA plus tard au cours de la vie (Zipursky 2003). Des mutations non-sense, faux-sense, insertions et délétions, altérant le cadre de lecture de *GATA1*, sont rapportées dans ces deux syndromes décrits (Wechsler, Greene et al. 2002). Ces mutations résident toutes dans l'exon 2 du gène et causent la perte de l'expression de la protéine entière, de 50kD. Cependant, les mutations n'abolissent pas complètement l'expression de *GATA1*, puisqu'un plus petit isoforme de 40kD, GATA1-s (GATA1 « short »), est exprimé (Calligaris, Bottardi et al. 1995). Les 2 domaines en doigts de zinc et le domaine C-terminal sont maintenus, alors que le domaine de transactivation N-terminal est perdu (Figure 39). Ceci suggère fortement que la perte de la protéine de 50kD, et l'expression concomitante de l'isoforme GATA1-s sont des facteurs essentiels dans le processus de leucémogénèse (Crispino 2005). Afin de vérifier si cette situation se présente dans notre cas d'insertion, il serait intéressant d'effectuer des études d'expression en employant deux paires d'amorces dont seulement amplifie l'exon 2 et donc spécifique à la forme longue de l'ARNm de *GATA1*, afin de différencier les niveaux d'expression des deux isoformes. En effet, dans les études d'expression que nous avons effectuées, les amorces utilisées ciblent les exons 4 et 5, communs aux deux isoformes et ne permettent donc pas de détecter des niveaux d'expression différents des deux isoformes dans le cas où ils auraient des expressions différentes. Dans une étude menée sur des souris, il a été mis en évidence

que des souris modifiées pour exprimer des niveaux réduits de *gata1* (l'allèle muté exprimant 5% du niveau normal) développaient des leucémies érythroblastique ou lymphoïdes B (Shimizu, Kuroha et al. 2004). Une diminution de l'expression de ce gène serait donc un facteur participant au processus leucémique.

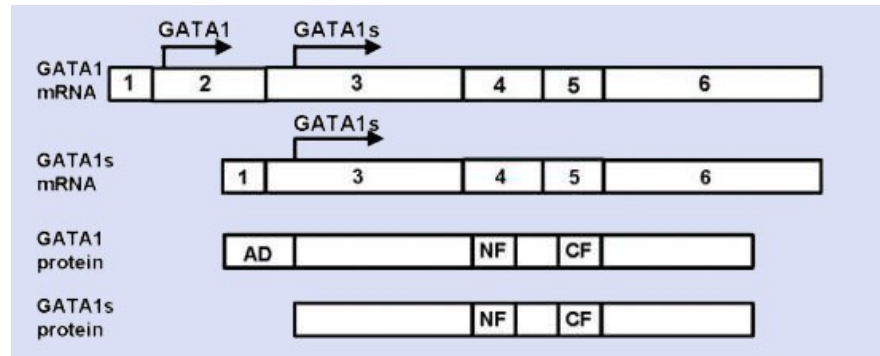


Figure 39: Les deux isoformes GATA1 et GATA1s du gène *GATA1*

L'ARNm de l'isoforme complet de *GATA1* contient tous les exons du gène alors que l'isoforme court, GATA1s ne contient pas l'exon 2. Ceci se traduit au niveau protéique par un isoforme GATA1s sans domaine d'activation. NF : N finger, CF : C finger, AD : activation domain. Tiré de <http://atlasgeneticsoncology.org/>

***MYB* (6q23.3) :**

MYB est un facteur de transcription de 75 kDa important dans la régulation des cellules souches et progénitrices de la moelle osseuse, des cryptes du colon, et du cerveau adulte (Emambokus, Vegiopoulos et al. 2003; Malaterre, Carpinelli et al. 2007; Malaterre, Mantamadiotis et al. 2008). Le gène, constitué de 15 exons, code pour trois régions régulatrices de liaison à l'ADN, un domaine de transactivation et un domaine de régulation négative (Figure 40).

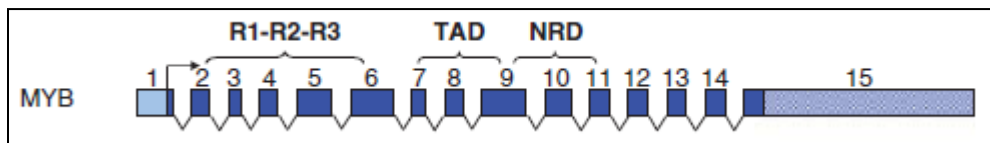


Figure 40: Structure du gène *MYB*

Ce gène contient 15 exons. R1,R2,R3: regulatory regions 1,2 et 3;TAD: transactivation domain; NRD: negative regulation domain. Adapté de Belloni, 2011.

Son expression est associée à des stades cellulaires immatures et prolifératifs, et est réprimée durant la maturation hématopoïétique (Oh and Reddy 1999). Son rôle important dans l'hématopoïèse, incluant la différenciation et prolifération, est maintenant connu. Ce gène agit principalement comme activateur de la transcription en se liant à un domaine de liaison spécifique (MBS, MYB binding site) (Sandberg, Sutton et al. 2005). Or nous avons détectés une augmentation d'expression, associée à des stades cellulaires de non différenciation. Cet arrêt de différenciation possible participerait au processus leucémique. L'activation transcriptionnelle de gènes cibles de *MYB* nécessite son domaine de transactivation, qui a comme fonction de recruter les coactivateurs CBP (*CREB-binding protein*) et p300 (Dai, Akimaru et al. 1996). Plus de 80 cibles cellulaires de ce facteur de transcription existent. Lors de la dérégulation de son expression, certaines de ces cibles contribueraient à transformer les cellules (Ramsay and Gonda 2008). Il est intéressant de noter aussi que *MYB* est localisé dans une région chromosomique fréquemment impliquée dans des réarrangements du cancer, dont des cancers hématologiques (Harper, Franchini et al. 1983). La surexpression de *MYB* a été démontrée dans les cancers du colon et du sein (Hugo, Cures et al. 2006). La première implication de *MYB* dans une translocation associée à une leucémie date de 2007, lorsque six cas de LLA-T associés à une t(6;7)(q23;q34) ont été rapportés chez de très jeunes enfants (Clappier, Cuccuini et al. 2007). Cette translocation entraînait la juxtaposition de *TCRβ* et *MYB* (Clappier, Cuccuini et al. 2007). De plus, la translocation (6;9)(q22-23;p23-24) a été décrite dans le carcinome adénoïde kystique avec la formation d'un transcript chimérique *MYB-NFIB* (Persson, Andren et al. 2009).

Durant l'hématopoïèse normale, l'expression de *GATA1* augmente alors que celle de *MYB* diminue lors de la différenciation des cellules progénitrices en érythrocytes (Bartunek, Kralova et al. 2003). Les premières étapes de l'hématopoïèse sont donc caractérisées par de hauts niveaux d'expression de *MYB* et des niveaux faibles de *GATA1*. Au fur et à mesure que l'hématopoïèse progresse, les niveaux de *GATA1* augmentent alors que ceux de *MYB* diminuent. Deux sites de liaison de *GATA1* ont été identifiés sur le promoteur de *MYB*

(Bartunek, Kralova et al. 2003). Il semblerait qu'une inhibition mutuelle entre ces deux gènes existe, et qu'elle est essentielle à la différenciation érythrocytaire (Takahashi, Suwabe et al. 2000). Dans le cas de l'insertion, une expression diminuée de *GATA1* et une expression légèrement augmentée de *MYB* sont observées. Ceci pourrait signifier que l'augmentation de l'expression de *MYB* agit pour inhiber l'expression de *GATA1* et bloquer la différenciation érythrocytaire.

***HDAC6* (Xp11.23) :**

HDAC6 (histone deacetylase 6) est une enzyme cytoplasmique régulant plusieurs processus cellulaires tels que la migration cellulaire, la réponse immunitaire et la dégradation de protéines ayant une structure tertiaire anormale (*misfolded*) (Valenzuela-Fernandez, Cabrero et al. 2008). Elle appartient à la classe IIb des histones déacetylases (HDACs) et est constituée de 1215 acides aminés, ce qui en fait la protéine la plus longue chez l'homme (Yang and Gregoire 2005). Elle contient deux domaines déacetylases, un domaine en doigt de zinc (domaine BUZ) et un domaine de répétition serine glutamine (domaine SE14) (Figure 41). Elle est normalement exprimée dans le cœur, le foie, les reins, les testicules, le cerveau et le pancréas (Verdel and Khochbin 1999).

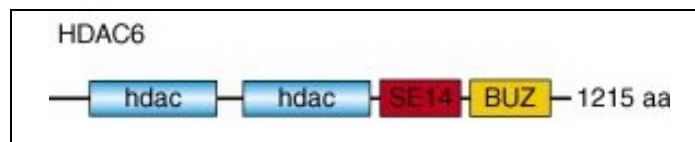


Figure 41: Structure du gène *HDAC6*

Le gène *HDAC6* contient 2 domaines déacetylases (hdac), un domaine en doigt de zinc (domaine BUZ) et un domaine de répétition serine glutamine (domaine SE14) Adapté de Valenzuela-Fernández, 2008.

En général, la déacétylation des histones favorise la condensation de la chromatine et ainsi l'inhibition de la transcription. L'inhibition de la déacétylation des histones devient de plus en plus importante comme nouvelle voie dans le traitement du cancer. Certaines HDACs, tels que *HDAC6*, agissent aussi sur des protéines cytoplasmiques autres que les histones.(Carew, Giles et al. 2008).

HDAC6 est impliquée dans la transformation maligne dans le cancer du sein en interagissant avec BRMS1 (breast cancer metastasis suppressor 1), un suppresseur de métastase, en diminuant son activité (Yoshida, Omoto et al. 2004). D'autres données suggèrent qu'elle est nécessaire dans la transformation oncogénique induite par la protéine Ras de la voie de signalisation RAS /MAPK et la survie des cellules tumorales, en assurant la prolifération cellulaire sans ancrage (*anchorage-independent*) (Lee, Lim et al. 2008). La surexpression de *HDAC6* a été identifiée dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et des modèles tumoraux chez la souris. Par exemple, son expression était plus élevée dans les cellules cancéreuses du carcinome ovarien que des cellules de lésions bénignes et cellules d'une lignée de cellules épithéliales ovariennes (Bazzaro, Lin et al. 2008). Dans une autre étude, HDAC6 était surexprimée dans les blastes d'une LMA et des lignées cellulaires myéloïdes (Bradbury, Khanim et al. 2005). Sa surexpression, tel qu'observée dans notre cas d'insertion, est donc rapportée comme facteur participant dans la leucémogénèse. Ainsi, cette histone déacétylase joue un rôle important dans le cancer ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante actuellement sous investigation. Au cours du cycle cellulaire, HDAC6 peut être inhibée par le gène suppresseur de tumeur *CYL* (*cylindromatosis*) ce qui entraîne un délai du cycle cellulaire. Ainsi, en ciblant HDAC6, certaines thérapies pourraient entraîner l'arrêt du cycle cellulaire et ainsi la prolifération de cellules transformées (Wickstrom, Masoumi et al. 2010).

D'autre part, HDAC6 a une grande affinité aux protéines aberrantes, marquées pour dégradation par ubiquitination. En se liant à ces protéines, la voie de dégradation est déclenchée ce qui permet d'éviter l'accumulation de ces protéines et ainsi la cellule tumorale échappe à l'apoptose (Rodriguez-Gonzalez, Lin et al. 2008).

Il serait intéressant d'étudier les niveaux d'expression de *GATA1*, *MYB* et *HDAC6* sur un plus grand nombre de cas sans réarrangement impliquant les chromosomes X et 6, afin d'évaluer la fréquence de leur dérégulation dans les leucémies aiguës pédiatriques.

WISP3 (6q21) :

WISP3 (WNT1 inducible signaling pathway protein 3), aussi désigné *CCN6*, est un membre de la famille CCN (*C*yr61 (cysteine-rich protein 61), *C*TGF (connective tissue growth factor), *N*ov (neuroblastoma overexpressed)) de protéines matricellulaires. Ces protéines modulent l'interaction des cellules avec la matrice extra-cellulaire. Les membres de cette famille partagent la même structure constituée d'un domaine SP (*signal peptide*) N-terminal suivi de 4 modules: le module I ayant des homologies la protéine IGFBP (*insulin-like growth factor binding protein*), le module II ayant des homologies avec le facteur vWC (*von Willebrand factor type C repeat*), le module III partageant des homologies avec TSP1 (*thrombospondin type 1 repeat*) et le module IV C-terminal riche en cystéine (Figure 42) (Chen and Lau 2009).

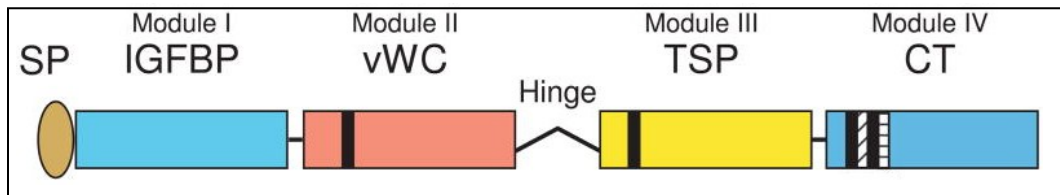


Figure 42: Structure des protéines CCN

Les protéines CCN partagent la même structure constituée d'un domaine SP et de 4 modules, I, II, III et IV. Adapté de Chen, 2009.

Elles agissent principalement en se liant à des récepteurs d'adhésion cellulaire tels que les intégrines, déclenchant des voies de transduction de signal et régulant ainsi l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération, la différenciation et la survie. Par ailleurs, ces protéines modulent l'activité de plusieurs facteurs de croissance et cytokines, tels que TGF- β (*transforming growth factor- β*), TNF α (*tumor necrosis factor α*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), BMPs (*bone morphogenetic protein*), et les protéines Wnt (Chen and Lau 2009). Parmi les 6 membres de cette famille, *WISP3* est le moins étudié.

Des mutations entraînant une perte de fonction de *WISP3* sont associées à l'arthropathie pseudorhumatoïde progressive infantile, une maladie dégénérative des articulations (Hurvitz, Suwairi et al. 1999). De plus, il a été démontré que l'expression de *WISP3* est

perdue dans 60% des carcinomes invasifs du sein. Cette perte est associée avec la présence de métastases ganglionnaires axillaires et la diminution de l'expression de E-cadhérine (Huang, Zhang et al. 2008). Aussi, la baisse de l'expression de *WISP3* permet aux cellules épithéliales mammaires d'échapper à l'apoptose et leur confère une survie indépendamment des facteurs de croissance. La baisse de l'expression de *WISP3* était associée à une surexpression de la protéine Akt-1 phosphorylée dans 21% du carcinome invasif du sein. Ainsi, *WISP3* contrôlerait la survie des cellules tumorales du sein en activant la voie PI3K/Akt-1 (Huang, Gonzalez et al. 2010). Ces évidences ouvrent une nouvelle voie thérapeutique pour les cancers invasifs, notamment du sein. Il serait nécessaire d'étudier les niveaux d'expression du gène *WISP3* afin de déterminer si son expression a été altérée suite à l'insertion. On s'attendrait à observer une perte ou une diminution de son expression car ceci est rapporté dans le cancer. Même si aucune fusion impliquant *WISP3* n'est rapportée, nous n'excluons pas la possibilité de présence d'une fusion *GATA1-WISP3* ou *HDAC6-WISP3* parmi les conséquences possibles de la formation du dérivé X.

Très récemment, chez un patient de six mois atteint de LMA-M5 associée à une t(X;6)(p11.2;q23), un transcrite de fusion *MYB-GATA1* a été mis en évidence et cloné. Les exons 1 à 8 du gène *MYB* étaient fusionnés aux exons 5 et 6 de *GATA1*. Ainsi trois domaines de liaison de l'ADN de *MYB* et un domaine en doigt de zinc de *GATA1* étaient préservés dans la fusion. Le patient étant un enfant de sexe masculin et *GATA1* situé sur le chromosome X, l'expression de *GATA1* sauvage était complètement perdue. Une surexpression de *MYB*, en plus du transcrite de fusion chimérique, était observée par des études d'expression. Chez des souris exprimant des niveaux réduits de *GATA1*, ce transcrite était capable d'induire la leucémie mais avec une faible pénétrance et une longue latence. La leucémie du patient en question démontrait un phénotype très agressif et une absence de réponse au traitement. Le patient est décédé deux mois après son diagnostic (Belloni, Shing et al. 2011).

L'interaction entre *GATA1* et *MYB* dans l'hématopoïèse et la présence de la fusion *MYB-GATA1* dans un cas de LMA récemment rapportée suggèrent que dans le cas présent d'insertion, l'interaction entre ces deux gènes serait centrale dans le processus leucémique. Cependant, le point de cassure au niveau de la bande 6q23.3 dans notre cas a été retrouvé en aval de *MYB* et non pas à l'intérieur du gène. Il serait intéressant de répéter les études d'expression, notamment de *GATA1* (tout en évaluant les niveaux d'expression de *GATA1* et *GATA1s*) et de *MYB*, et de réaliser des expériences de RT-PCR afin de déterminer s'il y a une fusion *MYB-GATA1*.

LA TRANSLOCATION (12;13)

Trois cas de t(12;13), deux dans une LAM et un dans une LAL, ont été étudiés. Par analyse du caryotype, l'implication des chromosomes 12 et 13 a été détectée pour les trois cas. L'analyse caryotypique n'est cependant pas suffisante car des points de cassure apparemment identiques au niveau cytogénétique pourraient impliquer des gènes différents au niveau moléculaire. À titre d'exemple, la translocation t(11;17)(q23;q21) dans la leucémie aigue myéloïde implique le gène *MLL* ou *BTB16 (PLZF)* en 11q23 et quatre gènes différents en 17q21 : *MLLT6(AF17)*, *LASP1*, *ACACA*, et *RARA* générant quatre gènes de fusion distincts. Ainsi, il est important de poursuivre avec une étude moléculaire. Par ailleurs, les résultats du panel de FISH ont démontré l'implication du gène *ETV6* dans les trois cas.

ETV6 (12p13) :

ETV6 (ets variant gene 6, aussi connu sous le nom de *TEL*) est un membre de la famille ETS (E-26 transforming specific) de FTs. Comme les autres protéines de cette famille, il contient le domaine conservé ETS C terminal, un domaine d'environ 88 acides aminés de liaison à l'ADN et d'interaction protéine-protéine (Oikawa and Yamada 2003). L'autre domaine conservé de cette famille est le domaine N-terminal HLH (*helix loop helix*), impliqué dans l'homo- et hétérodimerisation. Ce domaine, aussi appelé domaine SAM (*sterile alpha domain*) ou encore *pointed domain*, est impliqué dans l'interaction avec

d'autres facteurs de la famille ETS pour moduler l'activité transcriptionnelle (Grimshaw, Mott et al. 2004) (Figure 43). *ETV6* contient deux codons d'initiation (position 1 et position 43) menant à l'expression de deux isoformes de ce gène.

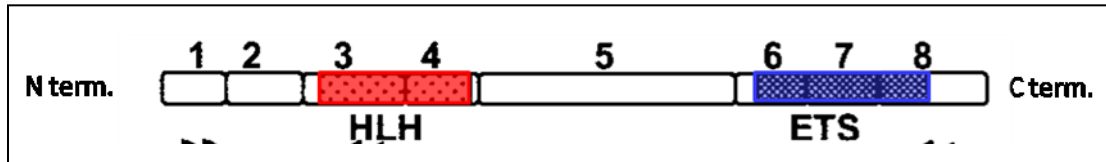


Figure 43: Structure du gène *ETV6*

Ce gène contient 8 exons. Deux sites conservés sont présents dans tous les membres de la famille ETS : le site HLH N-terminal (en rouge) et le site ETS C-terminal (en bleu). Adapté de Quiao, 2003.

Suite au clonage de la première fusion impliquant *ETV6*, à savoir la fusion *ETV6/PDGFRβ* de la translocation t(5;12)(q31;p13) dans un cas de leucémie myéломocyttaire chronique (CMML) en 1994, une panoplie de gènes de fusion partenaires ont été successivement identifiés. Leur nombre s'élève aujourd'hui à 26 (Golub, Barker et al. 1994). En général ces gènes partenaires sont soit des tyrosines kinases soit des facteurs de transcription (Figure 44).

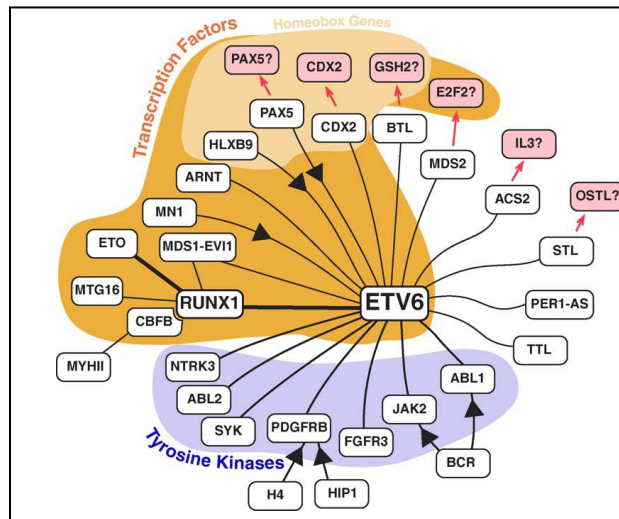


Figure 44: Hétérogénéité des partenaires de fusion d'*ETV6*

Les partenaires de fusion d'*ETV6* sont principalement soit des facteurs de transcription soit des tyrosines kinases. Tiré de Bohlander, 2005.

- Tyrosines kinases (TK):

Dans cette catégorie de partenaires de fusion d'*ETV6*, les réarrangements entraînent la fusion du domaine HLH N-terminal d'*ETV6* avec le domaine TK C-terminal du partenaire. Le maintien du domaine HLH dans la fusion est important car il permet la dimérisation de la protéine de fusion, ce qui entraîne l'activation constitutive du domaine TK et ainsi l'autophosphorylation de la protéine de fusion et de ses cibles (Spiekermann, Pau et al. 2002) (Figure 45). Des exemples de TK partenaires d'*ETV6* sont *PDGFRB* (5q31) et encore *ABL-1* (9q34). Les fusions *ETV6/TK* sont retrouvées dans un grand spectre de cancers hématologiques, comme les LMAs, LLAs-T, CMML et les syndromes myélodysplasiques, et non hématologiques tels que dans certaines tumeurs solides rares (ex : fibrosarcome congénital) (Bohlander 2005).

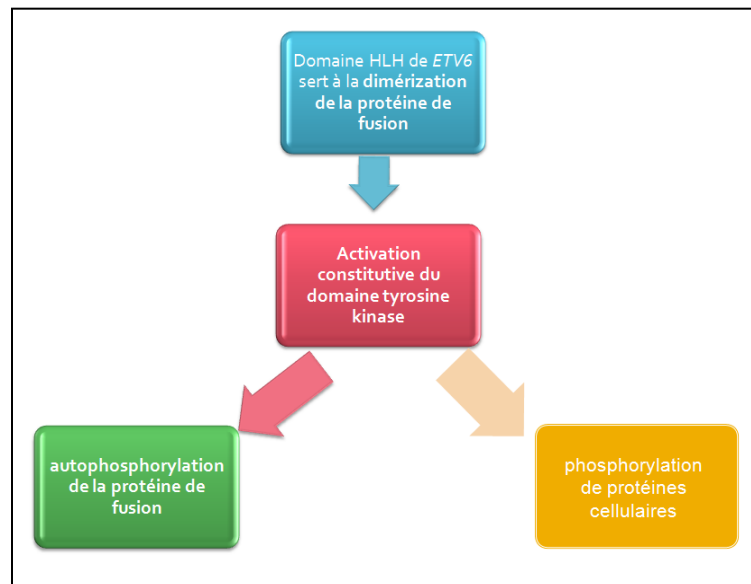


Figure 45: Conséquences de la fusion d'*ETV6* à un gène de tyrosine kinase

- Facteurs de transcription:

Les fusions d'*ETV6* avec un FT entraînent la fusion du domaine HLH d'*ETV6* au domaine de transactivation du FT. *RUNX1*, deuxième partenaire de fusion identifié après *PDGFRβ*, est un FT impliqué dans la fusion la plus fréquente des LLAs pédiatriques (Shurtleff, Buijs

et al. 1995). En effet, la fusion *ETV6-RUNX1* est non seulement la fusion la plus fréquente des LLAs pédiatriques mais aussi la fusion la plus fréquente d'*ETV6* (Shurtleff, Buijs et al. 1995). Les autres fusions d'*ETV6* avec des FTs, tels que *MN1*, *EVII*, *CDX2* et *TLL* pour n'en citer que quelques uns, sont beaucoup plus rares (Bohlander 2005) (Figure 46).

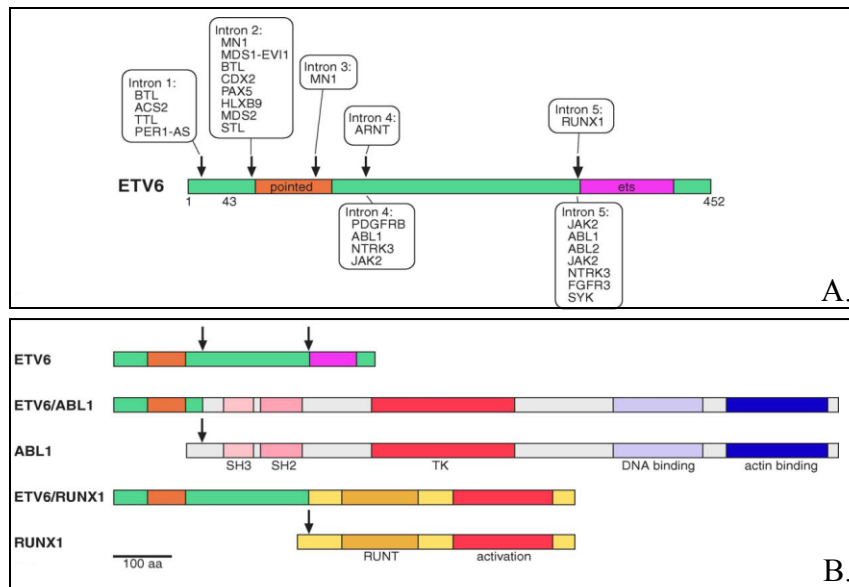


Figure 46: Exemples de fusions d'*ETV6*

A. Les domaines protéiques d'*ETV6*. La localisation des points de cassures impliqués dans différentes translocations et les partenaires de fusion sont indiqués. **B.** Schématisation des fusions *ETV6/ABL1* et *ETV6/RUNX1* avec la localisation du point de cassure au niveau de chaque gène.

L'allèle non réarrangé d'*ETV6* est souvent délété, ce qui suggère qu'*ETV6* serait un suppresseur de tumeur (Cave, Cacheux et al. 1997).

Même si plusieurs gènes de fusion partenaires d'*ETV6* ont été identifiés, les changements fonctionnels de ce gène engendrés par les translocations et impliqués dans la leucémogénèse ne sont pas complètement élucidés. Par conséquent, l'identification et la caractérisation de nouveaux partenaires de fusion contribueraient à la compréhension du rôle d'*ETV6* dans la leucémogénèse associée à des translocations impliquant ce gène.

La translocation (12;13)(p13;q12)

Le premier cas de translocation (12;13) étudié est celui d'un enfant atteint d'une LMA. Au niveau du chromosome 13, le point de cassure a été identifié au niveau du bac RP11-136G6 de la bande 13q12.2. Celui-ci couvre les gènes *CDX2* et *FLT3*, partenaires candidats de fusion avec *ETV6* dans le cas présent.

CDX2 (13q12.2) :

La t(12;13)(p13;q12) est une translocation récurrente rare rapportée dans plusieurs cancers hématologiques (Chase, Reiter et al. 1999). De plus, la bande 13q12 est impliquée dans la translocation rare t(8;13)(p11;q12) associée à un syndrome myéloprolifératif (Macdonald, Aguiar et al. 1995). Des délétions interstitielles de cette bande sont aussi associées à la myélofibrose primaire. Cependant, jusqu'en 1999, aucune fusion n'avait été mise en évidence. En 1999, Chase *et al.* rapportent trois cas de LMA associés à une t(12;13)(p13;q12) résultant par la fusion de *CDX2* et *ETV6* (Chase, Reiter et al. 1999). *CDX2* est un gène homeobox normalement non exprimé dans les cellules hématopoïétiques. Même si une association entre des mutations de ce gène et le cancer du colon avaient été suggérée, aucune implication dans la leucémie n'avait jusqu'à date été démontrée (Wicking, Simms et al. 1998). Cette translocation semble être hétérogène au niveau moléculaire puisque l'expression ectopique de *CDX2* a été détectée dans un cas seulement (Chase, Reiter et al. 1999). Dans ce dernier, deux types d'ARNm chimériques ont été détectés. L'un était une fusion de l'exon 2 d'*ETV6* avec l'exon 2 de *CDX2* conservant ainsi le domaine de liaison à l'ADN de *CDX2* mais perdant le domaine HLH d'*ETV6*, domaine généralement responsable de l'activité leucémogène de ce gène. L'autre contenait une insertion de matériel inconnu entre l'exon 2 d'*ETV6* et l'exon 2 de *CDX2*. Il a été suggéré que l'expression ectopique de *CDX2* serait responsable de la leucémogénèse dans la LMA et potentiellement dans d'autres types de leucémies. En 2003, un modèle murin de LMA portant une translocation t(12 ;13)(p13 ;q12) fut développé pour confirmer que l'expression ectopique de *CDX2*, et non la fusion *ETV6-CDX2* était responsable de la leucémogénèse. Des souris greffées avec des cellules de moelle osseuse exprimant *cdx2*, contrairement aux

souris exprimant *ETV6-CDX2*, ont développé une LMA fatale. De plus, 2 domaines se sont révélés essentiels à cette capacité de transformation : l'homéodomaine et le domaine de transactivation N-terminal. Ainsi, c'est l'activation du proto-oncogène *CDX2* par cette translocation balancée qui semble être l'événement leucémogène (Rawat, Cusan et al. 2004). Plus récemment, il a été démontré que *CDX2* est exprimé dans les cellules leucémiques de 90% des patients atteints de LMA. La surexpression de *CDX2* s'est révélée responsable de la dérégulation de l'expression des gènes *HOX* dans les cellules hématopoïétiques progénitrices chez la souris. Cette caractéristique est conférée par le domaine N-terminal (Scholl, Bansal et al. 2007).

Le deuxième candidat de fusion d'*ETV6* dans ce cas de t(12 ;13) est le gène *FLT3*.

FLT3 (13q12.2):

Récepteur tyrosine kinase de sous-classe III, *FLT3* joue un rôle important dans l'hématopoïèse et fait partie des gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers hématologiques (Stirewalt and Radich 2003). Ces mutations activatrices sont retrouvées dans près d'un tiers des patients avec LMA, et certains cas de LLA (Stirewalt and Radich 2003) , et entraînent une activité tyrosine kinase constitutive en absence de ligand (Mizuki, Fenski et al. 2000). En 2006, alors qu'aucune fusion de *FLT3* n'avait été rapportée, Vu *et al.* rapportent le cas d'un patient avec un syndrome myéloprolifératif associé à une translocation t(12;13)(p13;q12). Cette fusion contenait le domaine HLH d'*ETV6* et le domaine tyrosine kinase de *FLT3*. *FLT3* serait activé de façon aberrante par la dimérisation des domaines HLH d'*ETV6* dans les cellules leucémiques, ceci ayant des effets sur la prolifération et la différenciation des cellules leucémiques (Vu, Xinh et al. 2006).

Afin de déterminer lequel de ces 2 gènes est impliqué dans la translocation en question, des amorces devraient être choisies pour amplifier les transcrits *ETV6-CDX2* et *ETV6-FLT3* par RT-PCR, suivi par un séquençage. De possibles amorces à utiliser pour amplifier *ETV6-CDX2* seraient 5'-CCAGTGCCGAGTTACGCTTCCT-3' (*ETV6* exon 2) et

5'AGTGAAACTCCTTCTCCAGGTC-3' (*CDX2* exon 2). Pour vérifier ultérieurement la présence du transcrit *CDX2*, les amorces suivantes pourraient être utilisées: 5'-ATGTACGTGAGCTACCTCCTGG-3' (*CDX2* exon 1) et 5'-AGTGAAACTCCTTCTCCAGGTC-3' (*CDX2* exon 2) (Chase, Reiter et al. 1999). Si aucune amplification n'est détectée, le partenaire de fusion probable d'*ETV6* serait *FLT3*. Pour confirmer, des expériences de RT-PCR pourraient être effectuées avec les amorces suivantes: 5'-AACTTCTTAAATGACCGCGTCTGGC-3' (*ETV6* exon 1) 5'-ACGGCTTCTAGAGAAAAGTCTGGTG-3' (*FLT3* exon 24) pour *ETV6-FLT3*. 5'-GAGATCACAGAAGGAGTCTGGA-3' (*FLT3* exon 12) et 5'-TGTCTAAGGTGCTCCAGGGTC-3' (*ETV6* exon 8) pour *FLT3-ETV6*. Par ailleurs, la vérification de la présence du transcrit *ETV6* serait effectuée avec les amorces 5'-ATGTCTGAGACTCCTGCTCA-3' (*ETV6* exon 1) et 5'-TGTCTAAGGTGCTCCAGGGTC-3' (*ETV6* exon 8) et celle du transcrit *FLT3* avec les amorces 5'-GTATCAGAATCCCCGGAAGA-3' (*FLT3* exon 3) et 5'-TTAGCATCAACCGGAATGCC-3' (*FLT3* exon 22) (Vu, Xinh et al. 2006).

S'il s'avère que le gène *CDX2* est impliqué dans la fusion, Il s'agirait du quatrième cas de fusion d'*ETV6* et *CDX2* dans une LMA. Si *FLT3* est fusionné à *ETV6*, ceci serait le deuxième cas d'une telle fusion rapportée.

La translocation t(12;13)(p13;q14)

Le premier cas de cette translocation est celui du patient 4, jeune enfant atteint d'une LLA. L'allèle réarrangé d'*ETV6* était délété. Le point de cassure 13q a été retrouvé entre les locus *RBI* et *DI3S25* avec la délétion d'une région d'au moins 220Kb contenant les gènes codant pour les microARNs mir-15a et mir-16-1.

Le deuxième cas de cette translocation est celui du patient 5 avec une LMA pédiatrique. Dans ce cas, l'hybridation de la sonde LSI FKHR dual color breakapart a démontré un réarrangement de cette sonde, ce qui signifie qu'on est en présence d'une fusion *ETV6-FKHR* possible.

La bande 13q14 est une région impliquée dans des réarrangements de cancers hématologiques différents, de lignée myéloïde et lymphoblastique. La translocation t(12;13)(q12;q14), anomalie récurrente mais rare, a été rapportée dans des LLAs-préT, LLAs-préB, des LMAs (Raimondi, Privitera et al. 1991) et CMLs (Zitzelsberger, Bauchinger et al. 1990). Au moins 13 cas de t(12;13)(p13;q14) sont rapportés dans la littérature mais sans aucune caractérisation moléculaire jusqu'en 2001 quand le gène *TTL* a été identifié (Qiao, Ogawa et al. 2003). En 2001, Qiao et collaborateurs rapportent une t(12;13)(p13;q14) dans le cas d'une LLA pré-B chez un adulte de 46 ans (Qiao, Ogawa et al. 2003). Ce gène, nommé *TTL*, avait une expression faible mais ubiquitaire dans les tissus normaux. Dans les cellules leucémiques, les 2 transcrits de fusion *ETV6-TTL* et *TTL-ETV6* étaient exprimés. *TTL-ETV6* était cependant dominant et codait pour une protéine de fusion constituée de la partie N-terminale de *TTL* et les domaines HLH et ets d'*ETV6*. La fonction de *TTL* reste inconnue. Même si ce seul cas est chez un adulte, alors que notre cas a lieu chez un enfant, la rareté de l'implication de ce gène en faisait un candidat intéressant. Cependant, son implication a été exclue par FISH. Un nouveau partenaire de fusion d'*ETV6* serait donc impliqué dans cette translocation. Afin de le déterminer, des expériences de RACE-PCR (*Rapid amplification of cDNA ends- polymerase chain reaction*) afin de déterminer le partenaire de fusion. Le séquençage permettrait par la suite de déterminer la séquence de fusion, afin de mettre en évidence les domaines préservés et les domaines perdus de chaque gène suite à la translocation. La technique de RACE-PCR est une variation de la RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) qui permet d'amplifier des séquences inconnues 3' ou 5' d'un ADNc.

Les gènes *miR-15a* et *miR-16-1* (13q14):

Les micro-ARNs (miARNs) forment une grande famille de gènes non-codants impliqués dans la régulation temporelle et tissue-spécifique de l'expression d'autres gènes en ciblant des ARN messagers (ARNm) pour dégradation ou l'inhibition de leur translation, diminuant ainsi l'expression de la protéine correspondant (Bartel 2004). Les gènes codant pour les miARNs *miR-15a* et *miR-16-1* sont situés en 13q14, une région délétée dans plus

de la moitié des cas de LLC (Calin, Dumitru et al. 2002). Leur expression est aussi diminuée dans le carcinome de la prostate et l'adénome pituitaire (Bottoni, Piccin et al. 2005; Bonci, Coppola et al. 2008). Ces miARNs sont des suppresseurs de tumeur responsables de réprimer l'expression de plusieurs oncogènes dont *BCL2*, *MCL1*, *CCND1*, et *WNT3A* (Aqeilan, Calin et al. 2010). *BCL2* est un antiapoptotique favorisant la survie cellulaire (Cory and Adams 2002). Une perte de l'inhibition de *BCL2* par perte des miARNs miR-15a et miR-16-1 dans la LLC entraînerait sa surexpression et l'échappement de l'apoptose des cellules leucémiques, étape très importante dans la transformation. Il serait ainsi intéressant d'utiliser ces miARNs comme outils thérapeutiques dans les tumeurs exprimant *BCL2* (Cimmino, Calin et al. 2005). La surexpression de *BCL2* est rapportée dans des cas de lymphomes (Sanchez-Beato, Sanchez-Aguilera et al. 2003). La délétion de la région codant pour les miARNs miR-15a et miR-16-1 dans le cas étudié pourrait causer une surexpression de *BCL2*. Cette hypothèse reste cependant à vérifier en évaluant les niveaux d'expression de *BCL2* par RT-qPCR. Ces données offrent donc une nouvelle piste vers la pathogenèse des leucémies avec réarrangements d'*ETV6*.

***FOXO1* (13q14.11) :**

FOXO1, précédemment connu sous le nom de *FKHR*, est un facteur de transcription contenant 2 domaines importants : un domaine de liaison à l'ADN N-terminal et un domaine d'activation de la transcription riche en serine/thréonine dans sa partie C-terminale. Deux partenaires de fusion sont connus pour *FKHR* : *PAX3* et *PAX7*. En effet, les translocations t(2;13)(q35;q14) et t(1;13)(p36;q14), caractéristiques du rhabdomyosarcome alvéolaire (RMSA), un cancer pédiatrique du tissu mou, entraînent la fusion de *PAX3* (locus 2q35) et *PAX7* (locus 1p36) respectivement, à *FOXO1* (locus 13q14) (Figure 47). Les protéines chimères oncogéniques résultant de ces translocations ont un rôle dans la transformation cellulaire, la prolifération et la prévention de l'apoptose. En effet, elles contiennent les domaines de liaison à l'ADN de *PAX3/PAX7* et le domaine d'activation de la transcription de *FOXO1*. Il en résulte des protéines capables d'activer la transcription avec une efficacité supérieure que les protéines PAX sauvages

correspondants. La translocation $t(2;13)$ est présente dans 70% des cas de RMSA. Par ailleurs, les tumeurs *PAX7-FOXO1* positives ont une meilleure évolution que les tumeurs *PAX3-FOXO1* positives (Barr 2001; Xia, Pressey et al. 2002).

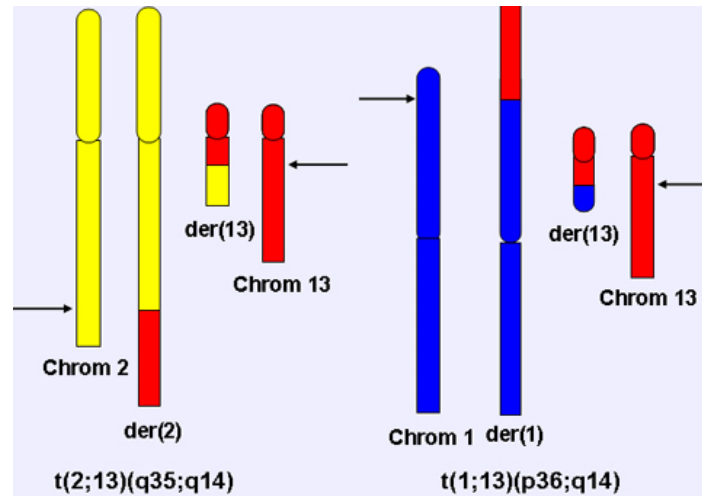


Figure 47: Fusion de *FOXO1* à *PAX3* et *PAX7* suite aux translocations $t(2;13)$ et $t(1;13)$ respectivement

Les translocations $t(2;13)(q35;q14)$ et $t(1;13)(p36;q14)$ caractérisent le rhabdomyosarcome alvéolaire et résultent en la formation des fusions *PAX3-FOXO1* et *PAX7-FOXO1* respectivement. Tiré de <http://atlasgeneticsoncology.org/>

Cependant, pour confirmer la présence de la fusion *ETV6-FOXO1*, il serait nécessaire d'appliquer en FISH des BACs ciblant le locus de *FOXO1* seulement. En effet, la sonde commerciale de Vysis LSI FKHR dual color breakapart couvre plusieurs régions différentes de la bande 13q14.11 sans nécessairement couvrir le locus du gène *FOXO1*. Le BAC RP11-627D15 serait un BAC intéressant à employer (Figure 48).



Figure 48: Régions chromosomiques couvertes par la sonde LSI FKHR dual color breakapart

Les régions indiquées en vert sont les régions ciblées par la sonde par le fluorochrome vert et la région en rouge indique la région ciblée avec le fluorochrome rouge. Adapté de www.genome.ucsc.edu.

CONCLUSION

La stratégie de détection d'anomalies chromosomiques, en combinant la cytogénétique standard et un panel de FISH, nous a permis d'identifier des réarrangements chromosomiques rares dans les leucémies aiguës pédiatriques. La caractérisation des points de cassure par clonage positionnel et l'étude d'expression ont permis de mettre en évidence des altérations de gènes importants dans l'hématopoïèse. En ce qui concerne l'insertion (X;6), l'altération des gènes *GATA1*, *HDAC6* et *MYB* a été mise en évidence. *GATA1* et *MYB* ayant des rôles majeurs au niveau de l'hématopoïèse, l'altération de leur expression, détectée par RT-qPCR, pourrait participer au processus leucémique. En ce qui concerne la t(12;13), un cas de fusion *ETV6-CDX2* ou *ETV6-FLT3* a été identifié dans une LMA. Le deuxième cas de LMA avec t(12;13) identifié impliquerait potentiellement *FOXO1*. Le cas de LLA avec t(12;13) n'a pas révélé de partenaire de fusion de *ETV6*. Un nouveau mécanisme de leucémogénèse, associant une coopération entre un gène de fusion impliquant *ETV6*, et une délétion des microARNs miARN-15a et miARN-16-1, serait en jeu. Par ailleurs, la recherche des points de cassure impliqués dans les trois cas de t(12;13) a révélé l'importance de cette caractérisation des points de cassure par FISH. En effet, des points de cassure apparemment identiques au niveau cytogénétique pourraient impliquer des gènes différents au niveau moléculaire. Il est donc important d'identifier les gènes impliqués. Ceci étant dit, le caryotype reste un outil essentiel dans la recherche de nouveaux réarrangements car il permet une vue non ciblée de l'ensemble des chromosomes. L'étude de nouvelles translocations est un outil essentiel pour mettre en évidence des altérations de gènes importants dans les leucémies. L'altération de ces gènes pourrait être plus fréquente que rapporté, et serait due à des mécanismes moléculaires et/ou épigénétiques non identifiables par techniques de cytogénétique. Les outils moléculaires de haute résolution tels que la technique de micropuces introduite récemment, permettent de détecter des gains et des pertes de moins de 10 Kb en augmentant le nombre de sondes hybridées, permettant ainsi la détection de délétion et duplication intragéniques. La quantité

d'information que fournit cette technologie ainsi que son coût élevé, restent toutefois des limites à son introduction dans le cadre clinique.

Une suite de cette étude de maîtrise serait de s'intéresser aux cas leucémiques qui semblent être « normaux » à la résolution du caryotype en bandes G et au panel de FISH. Ceux-ci seraient analysés par hybridation génomique comparative (CGH pour *Comparative Genomic Hybridization*) sur micropuces d'ADN et/ou le polymorphisme de nucléotide simple (SNP pour *Single Nucleotide Polymorphism*). La CGH permet de détecter des gains et pertes génomiques de petites tailles. La résolution du CGH sur micropuce dépend de la densité et de la taille des sondes, allant généralement de 80 à 200kb (Emanuel and Saitta 2007). Cette technique ne permet cependant pas de mettre en évidence des réarrangements équilibrés et le caryotype reste donc complémentaire et nécessaire. D'autre part, les puces de SNP permettent de détecter en plus les déséquilibres alléliques. Un SNP est une variation d'un seul nucléotide à une localisation spécifique du génome dont la fréquence de l'allèle mineur est supérieure à 1% dans la population. Il en existerait près de 10 millions dans tout le génome mais environ 5,6 millions de SNP ont été décrits. Les SNPs se retrouvent le plus souvent dans les régions non codantes du génome. Toutefois, quand ils sont présents dans des régions codantes tels que des régions régulatrices, ils peuvent affecter le taux de transcription (Dutt and Beroukhim 2007). Il serait ainsi possible d'identifier de nouvelles mutations qui seraient par la suite caractérisées par des méthodes de cytogénétique moléculaire et/ou biologie moléculaire et utilisées dans le suivi moléculaire de la maladie résiduelle. Cet outil pourrait par la suite être employé pour identifier des anomalies primaires ou secondaires responsables de résistance primaire (réponse sous-optimale au traitement d'induction) ou secondaires (rechute).

BLIOGRAPHIE

- Absalon, M. J. and F. O. Smith (2009). "Treatment strategies for pediatric acute myeloid leukemia." Expert Opin Pharmacother 10(1): 57-79.
- Aqeilan, R. I., G. A. Calin, et al. (2010). "miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives." Cell Death Differ 17(2): 215-220.
- Arico, M., M. Schrappe, et al. (2010). "Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005." J Clin Oncol 28(31): 4755-4761.
- Arico, M., M. G. Valsecchi, et al. (2000). "Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med 342(14): 998-1006.
- Aten, J. A., J. Stap, et al. (2004). "Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains." Science 303(5654): 92-95.
- Barr, F. G. (2001). "Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma." Oncogene 20(40): 5736-5746.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell 116(2): 281-297.
- Bartunek, P., J. Kralova, et al. (2003). "GATA-1 and c-myb crosstalk during red blood cell differentiation through GATA-1 binding sites in the c-myb promoter." Oncogene 22(13): 1927-1935.
- Bazzaro, M., Z. Lin, et al. (2008). "Ubiquitin proteasome system stress underlies synergistic killing of ovarian cancer cells by bortezomib and a novel HDAC6 inhibitor." Clin Cancer Res 14(22): 7340-7347.
- Behm, F. G., S. C. Raimondi, et al. (1996). "Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age." Blood 87(7): 2870-2877.
- Belloni, E., D. Shing, et al. (2011). "In vivo expression of an aberrant MYB-GATA1 fusion induces leukemia in the presence of GATA1 reduced levels." Leukemia.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, et al. (1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group." Br J Haematol 33(4): 451-458.
- Betts, D. R., R. A. Ammann, et al. (2007). "The prognostic significance of cytogenetic aberrations in childhood acute myeloid leukaemia. A study of the Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG)." Eur J Haematol 78(6): 468-476.
- Bohlander, S. K. (2005). "ETV6: a versatile player in leukemogenesis." Semin Cancer Biol 15(3): 162-174.
- Bonci, D., V. Coppola, et al. (2008). "The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities." Nat Med 14(11): 1271-1277.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med 3(7): 730-737.

- Bottoni, A., D. Piccin, et al. (2005). "miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas." J Cell Physiol 204(1): 280-285.
- Boyault, C., K. Sadoul, et al. (2007). "HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination." Oncogene 26(37): 5468-5476.
- Bradbury, C. A., F. L. Khanim, et al. (2005). "Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors." Leukemia 19(10): 1751-1759.
- Breit, S., M. Stanulla, et al. (2006). "Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia." Blood 108(4): 1151-1157.
- Broadfield, Z. J., R. D. Hain, et al. (2004). "Complex chromosomal abnormalities in utero, 5 years before leukaemia." Br J Haematol 126(3): 307-312.
- Brown, P., E. McIntyre, et al. (2007). "The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML." Blood 110(3): 979-985.
- Burke, M. J., B. Trotz, et al. (2009). "Allo-hematopoietic cell transplantation for Ph chromosome-positive ALL: impact of imatinib on relapse and survival." Bone Marrow Transplant 43(2): 107-113.
- Burmeister, T., N. Gokbuget, et al. (2006). "NUP214-ABL1 in adult T-ALL: the GMALL study group experience." Blood 108(10): 3556-3559.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, et al. (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A 99(24): 15524-15529.
- Calligaris, R., S. Bottardi, et al. (1995). "Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor." Proc Natl Acad Sci U S A 92(25): 11598-11602.
- Cantor, A. B. and S. H. Orkin (2001). "Hematopoietic development: a balancing act." Curr Opin Genet Dev 11(5): 513-519.
- Carew, J. S., F. J. Giles, et al. (2008). "Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy." Cancer Lett 269(1): 7-17.
- Cauwelier, B., N. Dastugue, et al. (2006). "Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRbeta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes." Leukemia 20(7): 1238-1244.
- Cave, H., V. Cacheux, et al. (1997). "ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia." Leukemia 11(9): 1459-1464.
- Chan, N. P., W. S. Wong, et al. (2004). "Childhood acute myeloid leukemia with CBFbeta-MYH11 rearrangement: study of incidence, morphology, cytogenetics, and clinical outcomes of Chinese in Hong Kong." Am J Hematol 76(3): 300-303.

- Chase, A., A. Reiter, et al. (1999). "Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13)(p13;q12)." Blood 93(3): 1025-1031.
- Chen, C. C. and L. F. Lau (2009). "Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins." Int J Biochem Cell Biol 41(4): 771-783.
- Chessells, J. M., C. J. Harrison, et al. (2002). "Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party." Leukemia 16(5): 776-784.
- Cheung, A. M., Y. L. Kwong, et al. (2006). "Stem cell model of hematopoiesis." Curr Stem Cell Res Ther 1(3): 305-315.
- Chou, W. C. and C. V. Dang (2005). "Acute promyelocytic leukemia: recent advances in therapy and molecular basis of response to arsenic therapies." Curr Opin Hematol 12(1): 1-6.
- Chowdhury, T. and H. J. Brady (2008). "Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia." Blood Cells Mol Dis 40(2): 192-199.
- Cimmino, A., G. A. Calin, et al. (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." Proc Natl Acad Sci U S A 102(39): 13944-13949.
- Clappier, E., W. Cuccuini, et al. (2007). "The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children." Blood 110(4): 1251-1261.
- Clarkson, B. D. and E. A. Boyse (1971). "Possible explanation of the high concordance for acute leukaemia in monozygotic twins." Lancet 1(7701): 699-701.
- Cools, J. (2010). "Identification and characterization of novel oncogenes in chronic eosinophilic leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia." Verh K Acad Geneesk Belg 72(1-2): 55-70.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer 2(9): 647-656.
- Cremer, T., M. Cremer, et al. (2006). "Chromosome territories--a functional nuclear landscape." Curr Opin Cell Biol 18(3): 307-316.
- Creutzig, U., M. Zimmermann, et al. (2005). "Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials." Leukemia 19(12): 2030-2042.
- Crispino, J. D. (2005). "GATA1 in normal and malignant hematopoiesis." Semin Cell Dev Biol 16(1): 137-147.
- Crispino, J. D., M. B. Lodish, et al. (1999). "Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex." Mol Cell 3(2): 219-228.
- Dai, P., H. Akimaru, et al. (1996). "CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb." Genes Dev 10(5): 528-540.
- Dastugue, N., E. Duchayne, et al. (1997). "Acute basophilic leukaemia and translocation t(X;6)(p11;q23)." Br J Haematol 98(1): 170-176.

- Delattre, O., J. Zucman, et al. (1992). "Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours." Nature 359(6391): 162-165.
- Dutt, A. and R. Beroukhi (2007). "Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer." Curr Opin Oncol 19(1): 43-49.
- Elagib, K. E., F. K. Racke, et al. (2003). "RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation." Blood 101(11): 4333-4341.
- Emambokus, N., A. Vegiopoulos, et al. (2003). "Progression through key stages of haemopoiesis is dependent on distinct threshold levels of c-Myb." EMBO J 22(17): 4478-4488.
- Emanuel, B. S. and S. C. Saitta (2007). "From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements." Nat Rev Genet 8(11): 869-883.
- Evans, T. and G. Felsenfeld (1989). "The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein." Cell 58(5): 877-885.
- Evans, T., M. Reitman, et al. (1988). "An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes." Proc Natl Acad Sci U S A 85(16): 5976-5980.
- Felix, C. A., C. P. Kolaris, et al. (2006). "Topoisomerase II and the etiology of chromosomal translocations." DNA Repair (Amst) 5(9-10): 1093-1108.
- Fey, M. F. (2007). "Normal and malignant hematopoiesis." Ann Oncol 18 Suppl 1: i9-i13.
- Ford, A. M., C. A. Bennett, et al. (1998). "Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A 95(8): 4584-4588.
- Frohling, S. and H. Dohner (2008). "Chromosomal abnormalities in cancer." N Engl J Med 359(7): 722-734.
- Futreal, P. A., L. Coin, et al. (2004). "A census of human cancer genes." Nat Rev Cancer 4(3): 177-183.
- Gale, K. B., A. M. Ford, et al. (1997). "Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots." Proc Natl Acad Sci U S A 94(25): 13950-13954.
- Galloway, J. L., R. A. Wingert, et al. (2005). "Loss of gata1 but not gata2 converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos." Dev Cell 8(1): 109-116.
- Goldberg, J. M., L. B. Silverman, et al. (2003). "Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience." J Clin Oncol 21(19): 3616-3622.
- Golub, T. R., G. F. Barker, et al. (1995). "Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A 92(11): 4917-4921.
- Golub, T. R., G. F. Barker, et al. (1994). "Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation." Cell 77(2): 307-316.
- Graux, C., J. Cools, et al. (2004). "Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia." Nat Genet 36(10): 1084-1089.

- Greaves, M. F., A. T. Maia, et al. (2003). "Leukemia in twins: lessons in natural history." Blood 102(7): 2321-2333.
- Greaves, M. F. and J. Wiemels (2003). "Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia." Nat Rev Cancer 3(9): 639-649.
- Grimshaw, S. J., H. R. Mott, et al. (2004). "Structure of the sterile alpha motif (SAM) domain of the *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase pathway-modulating protein STE50 and analysis of its interaction with the STE11 SAM." J Biol Chem 279(3): 2192-2201.
- Gue, M., J. S. Sun, et al. (2006). "Simultaneous localization of MLL, AF4 and ENL genes in interphase nuclei by 3D-FISH: MLL translocation revisited." BMC Cancer 6: 20.
- Hall, G. W. (2001). "Childhood myeloid leukaemias." Best Pract Res Clin Haematol 14(3): 573-591.
- Hama, A., H. Yagasaki, et al. (2008). "Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) in children: a comparison of AMKL with and without Down syndrome." Br J Haematol 140(5): 552-561.
- Harper, M. E., G. Franchini, et al. (1983). "Chromosomal sublocalization of human *c-myc* and *c-fes* cellular onc genes." Nature 304(5922): 169-171.
- Harrison, C. J. (2009). "Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol 144(2): 147-156.
- Harrison, C. J., A. V. Moorman, et al. (2005). "Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study." Br J Haematol 129(4): 520-530.
- Harrison, C. J., A. V. Moorman, et al. (2004). "Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol 125(5): 552-559.
- Hasle, H., T. A. Alonzo, et al. (2007). "Monosomy 7 and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study." Blood 109(11): 4641-4647.
- Herbst, A. L., H. Ulfelder, et al. (1971). "Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women." N Engl J Med 284(15): 878-881.
- Ho, P. A., T. A. Alonzo, et al. (2009). "Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group." Blood 113(26): 6558-6566.
- Hoffbrand, A. V. and J. E. Pettit (1993). Essential Hematology, Blackwell scientific.
- Huang, W., M. E. Gonzalez, et al. (2010). "Blockade of CCN6 (WISP3) activates growth factor-independent survival and resistance to anoikis in human mammary epithelial cells." Cancer Res 70(8): 3340-3350.
- Huang, W., Y. Zhang, et al. (2008). "Inhibition of CCN6 (Wnt-1-induced signaling protein 3) down-regulates E-cadherin in the breast epithelium through induction of snail and ZEB1." Am J Pathol 172(4): 893-904.

- Hugo, H., A. Cures, et al. (2006). "Mutations in the MYB intron I regulatory sequence increase transcription in colon cancers." Genes Chromosomes Cancer 45(12): 1143-1154.
- Hurvitz, J. R., W. M. Suwairi, et al. (1999). "Mutations in the CCN gene family member WISP3 cause progressive pseudorheumatoid dysplasia." Nat Genet 23(1): 94-98.
- Imai, Y., M. Kurokawa, et al. (2004). "The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1." Mol Cell Biol 24(3): 1033-1043.
- Isoda, T., A. M. Ford, et al. (2009). "Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring." Proc Natl Acad Sci U S A 106(42): 17882-17885.
- Kaspers, G. J. and C. M. Zwaan (2007). "Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients." Haematologica 92(11): 1519-1532.
- Kelly, L. M. and D. G. Gilliland (2002). "Genetics of myeloid leukemias." Annu Rev Genomics Hum Genet 3: 179-198.
- Kempski, H., J. Chalker, et al. (1999). "An investigation of the t(12;21) rearrangement in children with B-precursor acute lymphoblastic leukaemia using cytogenetic and molecular methods." Br J Haematol 105(3): 684-689.
- Kempski, H., K. A. Mensa-Bonsu, et al. (2003). "Prenatal chromosomal diversification of leukemia in monozygotic twins." Genes Chromosomes Cancer 37(4): 406-411.
- Kim, S. I. and E. H. Bresnick (2007). "Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles." Oncogene 26(47): 6777-6794.
- Kitabayashi, I., A. Yokoyama, et al. (1998). "Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation." EMBO J 17(11): 2994-3004.
- Kufe, D. W., P. P. Major, et al. (1980). "Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA." J Biol Chem 255(19): 8997-8900.
- Kuppers, R. (2005). "Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis." Nat Rev Cancer 5(4): 251-262.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature 367(6464): 645-648.
- Larson, R. A., M. M. Le Beau, et al. (1992). "Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 in therapy-related leukemia." Blood 79(7): 1892-1893.
- Lee, Y. S., K. H. Lim, et al. (2008). "The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis." Cancer Res 68(18): 7561-7569.
- Licht, J. D. and D. W. Sternberg (2005). "The molecular pathology of acute myeloid leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 137-142.
- Lieber, M. R., K. Yu, et al. (2006). "Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations." DNA Repair (Amst) 5(9-10): 1234-1245.

- Liew, C. W., K. D. Rand, et al. (2006). "Molecular analysis of the interaction between the hematopoietic master transcription factors GATA-1 and PU.1." J Biol Chem 281(38): 28296-28306.
- Lightfoot, T. J. and E. Roman (2004). "Causes of childhood leukaemia and lymphoma." Toxicol Appl Pharmacol 199(2): 104-117.
- Linet, M. S. and S. S. Devesa (1991). "Descriptive epidemiology of childhood leukaemia." Br J Cancer 63(3): 424-429.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25(4): 402-408.
- Lutterbach, B., J. J. Westendorf, et al. (2000). "A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia." J Biol Chem 275(1): 651-656.
- Macdonald, D., R. C. Aguiar, et al. (1995). "A new myeloproliferative disorder associated with chromosomal translocations involving 8p11: a review." Leukemia 9(10): 1628-1630.
- Maia, A. T., J. Koechling, et al. (2004). "Protracted postnatal natural histories in childhood leukemia." Genes Chromosomes Cancer 39(4): 335-340.
- Malaterre, J., M. Carpinelli, et al. (2007). "c-Myb is required for progenitor cell homeostasis in colonic crypts." Proc Natl Acad Sci U S A 104(10): 3829-3834.
- Malaterre, J., T. Mantamadiotis, et al. (2008). "c-Myb is required for neural progenitor cell proliferation and maintenance of the neural stem cell niche in adult brain." Stem Cells 26(1): 173-181.
- Mehaffey, M. G., A. L. Newton, et al. (2001). "X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1." Blood 98(9): 2681-2688.
- Meshinchi, S. and R. J. Arceci (2007). "Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia." Oncologist 12(3): 341-355.
- Minotti, G., P. Menna, et al. (2004). "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity." Pharmacol Rev 56(2): 185-229.
- Mitani, K., S. Ogawa, et al. (1994). "Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia." EMBO J 13(3): 504-510.
- Miyoshi, H., K. Shimizu, et al. (1991). "t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1." Proc Natl Acad Sci U S A 88(23): 10431-10434.
- Mizuki, M., R. Fenski, et al. (2000). "Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways." Blood 96(12): 3907-3914.
- Moorman, A. V., S. M. Richards, et al. (2007). "Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21)." Blood 109(6): 2327-2330.

- Mori, H., S. M. Colman, et al. (2002). "Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development." Proc Natl Acad Sci U S A 99(12): 8242-8247.
- Mori, T., A. Manabe, et al. (2001). "Allogeneic bone marrow transplantation in first remission rescues children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) studies L89-12 and L92-13." Med Pediatr Oncol 37(5): 426-431.
- Nachman, J. B., N. A. Heerema, et al. (2007). "Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia." Blood 110(4): 1112-1115.
- Nakamura, T., H. Alder, et al. (1993). "Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs." Proc Natl Acad Sci U S A 90(10): 4631-4635.
- Nichols, K. E., J. D. Crispino, et al. (2000). "Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1." Nat Genet 24(3): 266-270.
- Nickoloff, J. A., L. P. De Haro, et al. (2008). "Mechanisms of leukemia translocations." Curr Opin Hematol 15(4): 338-345.
- Nijnik, A., L. Woodbine, et al. (2007). "DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing." Nature 447(7145): 686-690.
- Ogawa, E., M. Inuzuka, et al. (1993). "Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha." Virology 194(1): 314-331.
- Oh, I. H. and E. P. Reddy (1999). "The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis." Oncogene 18(19): 3017-3033.
- Oikawa, T. and T. Yamada (2003). "Molecular biology of the Ets family of transcription factors." Gene 303: 11-34.
- Orkin, S. H. and L. I. Zon (2008). "Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology." Cell 132(4): 631-644.
- Owen, C., M. Barnett, et al. (2008). "Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia--a review." Br J Haematol 140(2): 123-132.
- Papadopoulos, P., S. A. Ridge, et al. (1995). "The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL." Cancer Res 55(1): 34-38.
- Parkin, D. M., C. A. Stiller, et al. (1988). "The international incidence of childhood cancer." Int J Cancer 42(4): 511-520.
- Passegue, E. and I. L. Weisman (2005). "Leukemic stem cells: where do they come from?" Stem Cell Rev 1(3): 181-188.
- Patel, N., L. K. Goff, et al. (2003). "Expression profile of wild-type ETV6 in childhood acute leukaemia." Br J Haematol 122(1): 94-98.
- Persson, M., Y. Andren, et al. (2009). "Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck." Proc Natl Acad Sci U S A 106(44): 18740-18744.

- Pieters, R., M. Schrappe, et al. (2007). "A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial." Lancet 370(9583): 240-250.
- Pui, C. H. and W. E. Evans (1998). "Acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med 339(9): 605-615.
- Pui, C. H., P. S. Gaynon, et al. (2002). "Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region." Lancet 359(9321): 1909-1915.
- Qiao, Y., S. Ogawa, et al. (2003). "Identification of a novel fusion gene, TTL, fused to ETV6 in acute lymphoblastic leukemia with t(12;13)(p13;q14), and its implication in leukemogenesis." Leukemia 17(6): 1112-1120.
- Querfurth, E., M. Schuster, et al. (2000). "Antagonism between C/EBPbeta and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors." Genes Dev 14(19): 2515-2525.
- Raimondi, S. C., F. G. Behm, et al. (1990). "Cytogenetics of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implications of the t(1;19)." J Clin Oncol 8(8): 1380-1388.
- Raimondi, S. C., E. Privitera, et al. (1991). "New recurring chromosomal translocations in childhood acute lymphoblastic leukemia." Blood 77(9): 2016-2022.
- Ramsay, R. G. and T. J. Gonda (2008). "MYB function in normal and cancer cells." Nat Rev Cancer 8(7): 523-534.
- Rawat, V. P., M. Cusan, et al. (2004). "Ectopic expression of the homeobox gene Cdx2 is the transforming event in a mouse model of t(12;13)(p13;q12) acute myeloid leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A 101(3): 817-822.
- Rhodes, J., A. Hagen, et al. (2005). "Interplay of pu.1 and gata1 determines myeloid progenitor cell fate in zebrafish." Dev Cell 8(1): 97-108.
- Richardson, C. and M. Jasin (2000). "Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks." Nature 405(6787): 697-700.
- Ries, L., D. Melbert, et al. (2008). "SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005." from http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/.
- Rodriguez-Gonzalez, A., T. Lin, et al. (2008). "Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation." Cancer Res 68(8): 2557-2560.
- Romana, S. P., M. Mauchauffe, et al. (1995). "The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion." Blood 85(12): 3662-3670.
- Rompaey, L. V., M. Potter, et al. (2000). "Tel induces a G1 arrest and suppresses Ras-induced transformation." Oncogene 19(46): 5244-5250.
- Rossi, D. J., D. Bryder, et al. (2005). "Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging." Proc Natl Acad Sci U S A 102(26): 9194-9199.
- Rubnitz, J. E. (2008). "Childhood acute myeloid leukemia." Curr Treat Options Oncol 9(1): 95-105.

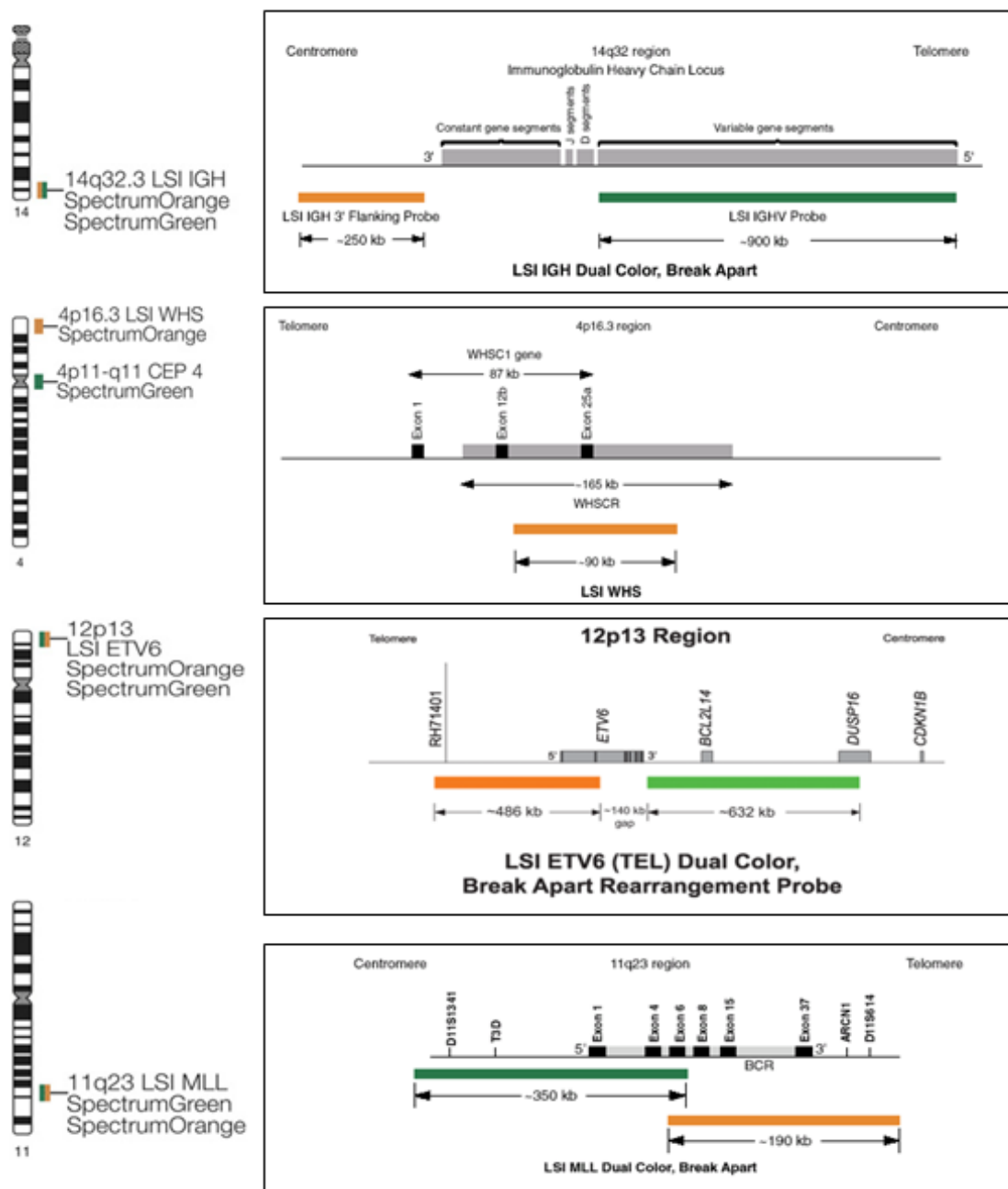
- Rubnitz, J. E., S. C. Raimondi, et al. (2002). "Favorable impact of the t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia." J Clin Oncol 20(9): 2302-2309.
- Rylski, M., J. J. Welch, et al. (2003). "GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation." Mol Cell Biol 23(14): 5031-5042.
- Sanchez-Beato, M., A. Sanchez-Aguilera, et al. (2003). "Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas." Blood 101(4): 1220-1235.
- Sandberg, M. L., S. E. Sutton, et al. (2005). "c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation." Dev Cell 8(2): 153-166.
- Schoch, C., D. Haase, et al. (1996). "Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor." Leukemia 10(8): 1288-1295.
- Scholl, C., D. Bansal, et al. (2007). "The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis." J Clin Invest 117(4): 1037-1048.
- Scholl, C., D. G. Gilliland, et al. (2008). "Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia." Semin Oncol 35(4): 336-345.
- Schultz, K. R., W. P. Bowman, et al. (2009). "Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study." J Clin Oncol 27(31): 5175-5181.
- Seibel, N. L. (2008). "Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 374-380.
- Shimada, A., T. Taki, et al. (2008). "Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese childhood AML Cooperative Study Group." Pediatr Blood Cancer 50(2): 264-269.
- Shimada, A., T. Taki, et al. (2006). "KIT mutations, and not FLT3 internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group." Blood 107(5): 1806-1809.
- Shimizu, R., J. D. Engel, et al. (2008). "GATA1-related leukaemias." Nat Rev Cancer 8(4): 279-287.
- Shimizu, R., T. Kuroha, et al. (2004). "Leukemogenesis caused by incapacitated GATA-1 function." Mol Cell Biol 24(24): 10814-10825.
- Shurtleff, S. A., A. Buijs, et al. (1995). "TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis." Leukemia 9(12): 1985-1989.
- Sorensen, P. H., S. L. Lessnick, et al. (1994). "A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG." Nat Genet 6(2): 146-151.
- Spiekermann, K., M. Pau, et al. (2002). "Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and

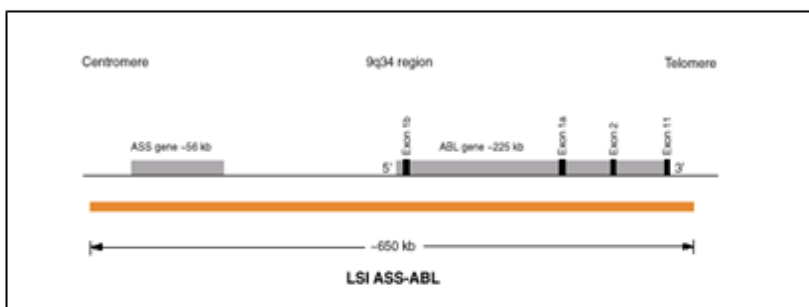
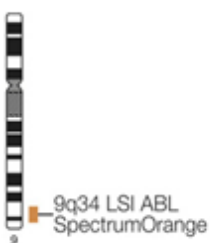
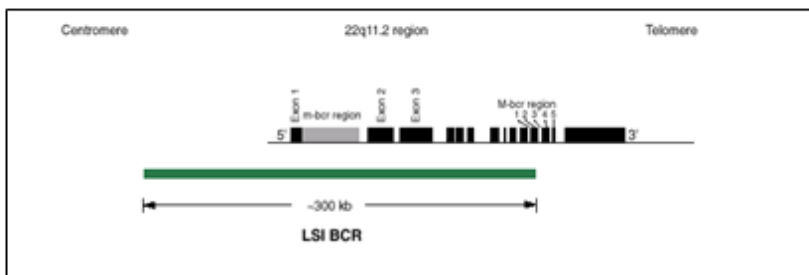
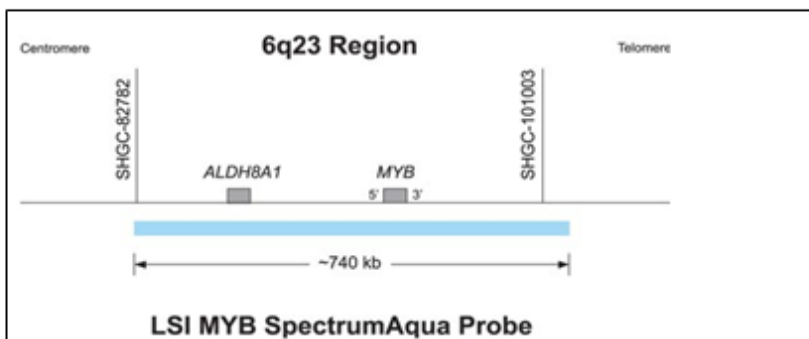
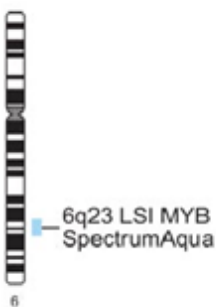
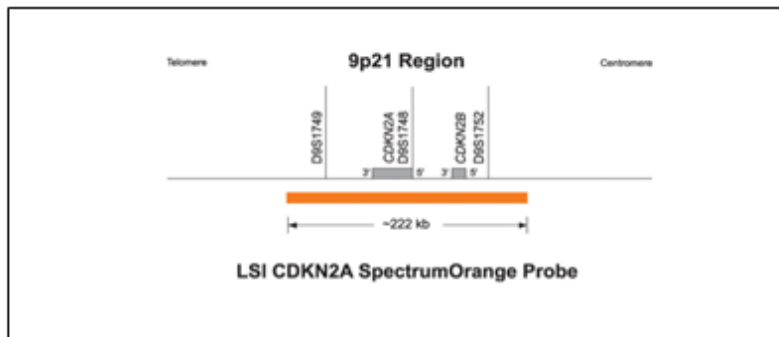
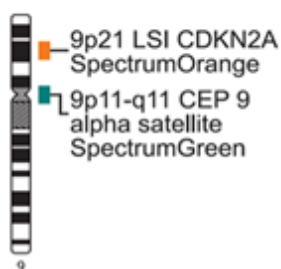
- is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells." Exp Hematol 30(3): 262-271.
- Stewart, A., J. Webb, et al. (1958). "A survey of childhood malignancies." Br Med J 1(5086): 1495-1508.
- Stirewalt, D. L. and J. P. Radich (2003). "The role of FLT3 in haematopoietic malignancies." Nat Rev Cancer 3(9): 650-665.
- Strong, S. J. and G. Corney (1967). The placenta in twin pregnancy. Oxford, United kingdom, Pergamon Press
- Strout, M. P., G. Marcucci, et al. (1998). "The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A 95(5): 2390-2395.
- Sudo, K., H. Ema, et al. (2000). "Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells." J Exp Med 192(9): 1273-1280.
- Sutcliffe, M. J., J. J. Shuster, et al. (2005). "High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative." Leukemia 19(5): 734-740.
- Takahashi, T., N. Suwabe, et al. (2000). "Inhibitory interaction of c-Myb and GATA-1 via transcriptional co-activator CBP." Oncogene 19(1): 134-140.
- Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, et al. (2005). "Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer." Science 310(5748): 644-648.
- Tsai, S. F., D. I. Martin, et al. (1989). "Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells." Nature 339(6224): 446-451.
- Tsang, A. P., Y. Fujiwara, et al. (1998). "Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG." Genes Dev 12(8): 1176-1188.
- Unniraman, S. and D. G. Schatz (2006). "AID and Igh switch region-Myc chromosomal translocations." DNA Repair (Amst) 5(9-10): 1259-1264.
- Valenzuela-Fernandez, A., J. R. Cabrero, et al. (2008). "HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions." Trends Cell Biol 18(6): 291-297.
- Verdel, A. and S. Khochbin (1999). "Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers." J Biol Chem 274(4): 2440-2445.
- von Bergh, A. R., E. van Drunen, et al. (2006). "High incidence of t(7;12)(q36;p13) in infant AML but not in infant ALL, with a dismal outcome and ectopic expression of HLXB9." Genes Chromosomes Cancer 45(8): 731-739.
- Vu, H. A., P. T. Xinh, et al. (2006). "FLT3 is fused to ETV6 in a myeloproliferative disorder with hypereosinophilia and a t(12;13)(p13;q12) translocation." Leukemia 20(8): 1414-1421.

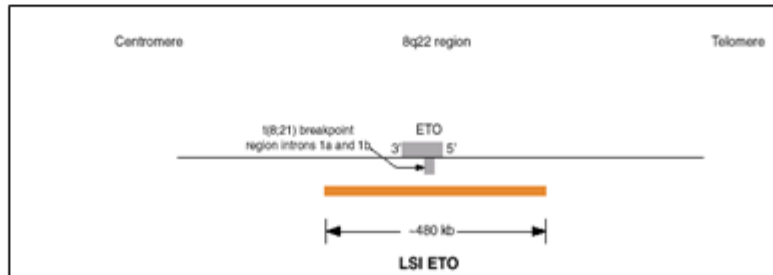
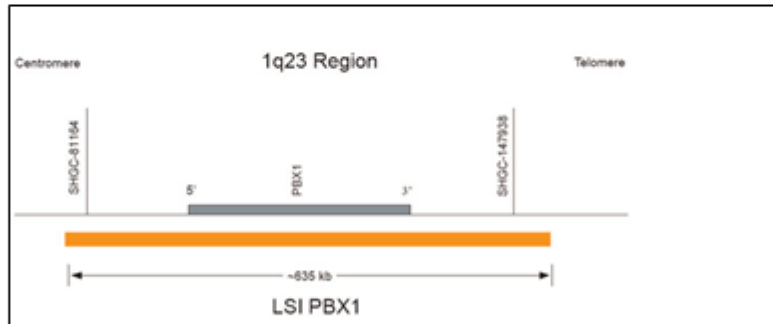
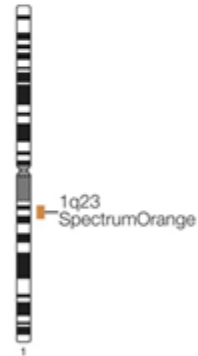
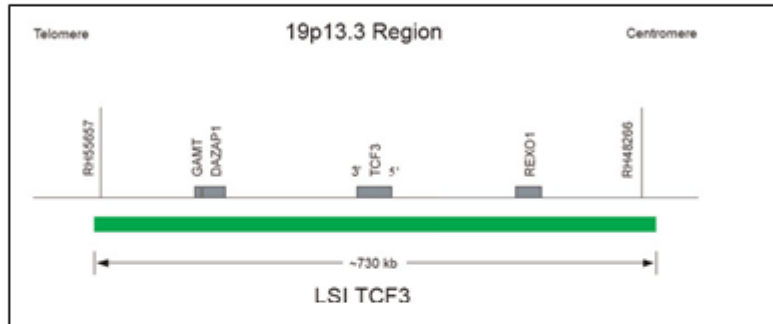
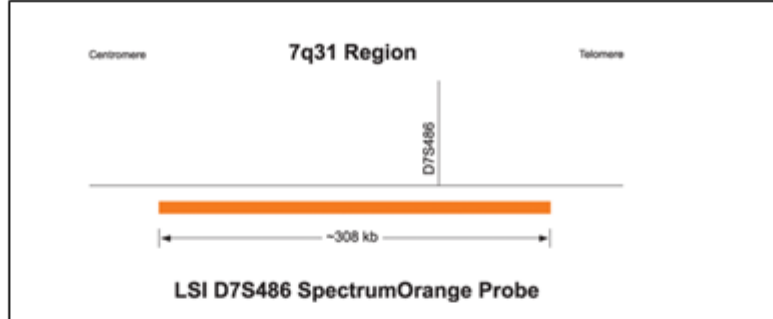
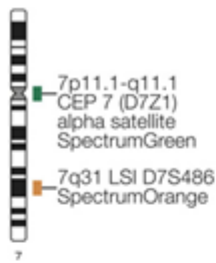
- Wechsler, J., M. Greene, et al. (2002). "Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome." Nat Genet 32(1): 148-152.
- Wicking, C., L. A. Simms, et al. (1998). "CDX2, a human homologue of *Drosophila* caudal, is mutated in both alleles in a replication error positive colorectal cancer." Oncogene 17(5): 657-659.
- Wickstrom, S. A., K. C. Masoumi, et al. (2010). "CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin." EMBO J 29(1): 131-144.
- Wiemels, J. L., F. E. Alexander, et al. (2000). "Microclustering of TEL-AML1 translocation breakpoints in childhood acute lymphoblastic leukemia." Genes Chromosomes Cancer 29(3): 219-228.
- Wiemels, J. L., G. Cazzaniga, et al. (1999). "Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children." Lancet 354(9189): 1499-1503.
- Wiemels, J. L., A. M. Ford, et al. (1999). "Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero." Blood 94(3): 1057-1062.
- Wiemels, J. L., Z. Xiao, et al. (2002). "In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia." Blood 99(10): 3801-3805.
- Xia, S. J., J. G. Pressey, et al. (2002). "Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma." Cancer Biol Ther 1(2): 97-104.
- Xu, W., H. F. Zhou, et al. (2008). "Trisomy 22 as the sole abnormality is an important marker for the diagnosis of acute myeloid leukemia with inversion 16." Onkologie 31(8-9): 440-444.
- Yang, X. J. and S. Gregoire (2005). "Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication." Mol Cell Biol 25(8): 2873-2884.
- Yoshida, N., Y. Omoto, et al. (2004). "Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes." Cancer Sci 95(6): 496-502.
- Zelent, A., M. Greaves, et al. (2004). "Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia." Oncogene 23(24): 4275-4283.
- Zipursky, A. (2003). "Transient leukaemia--a benign form of leukaemia in newborn infants with trisomy 21." Br J Haematol 120(6): 930-938.
- Zitzelsberger, H., M. Bauchinger, et al. (1990). "Cytogenetic and molecular analysis of a "masked" Philadelphia chromosome in chronic and blastic phases of chronic myeloid leukemia." Cancer Genet Cytogenet 47(2): 219-225.

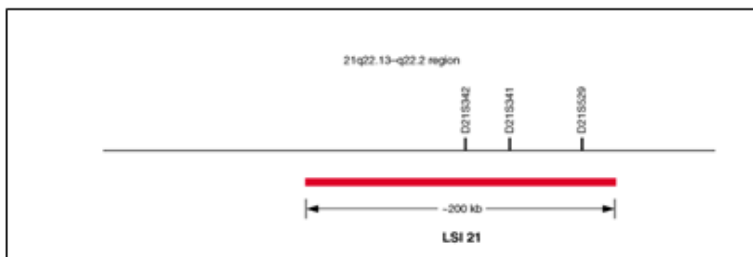
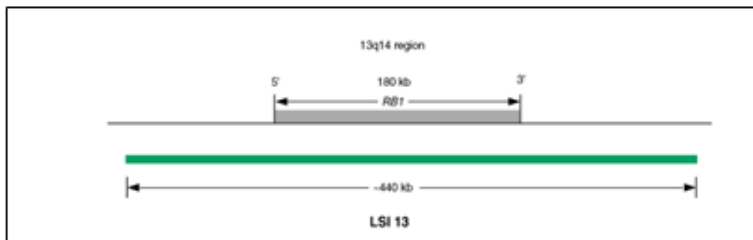
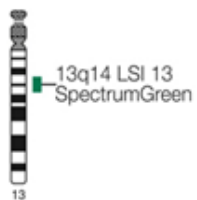
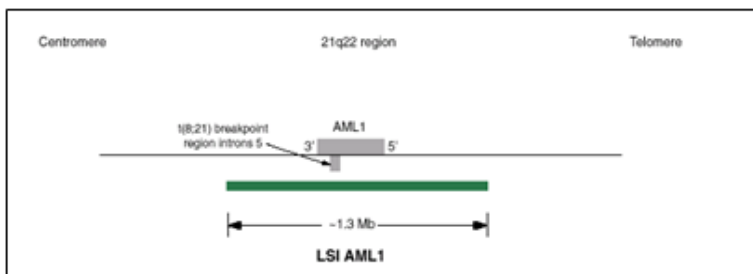
ANNEXES

ANNEXE 1: LOCALISATION DES DIFFÉRENTES SONDES UTILISÉES DANS LE PANEL DES LEUCÉMIES LYMPHOBLASTIQUES AIGÜES EN FISH



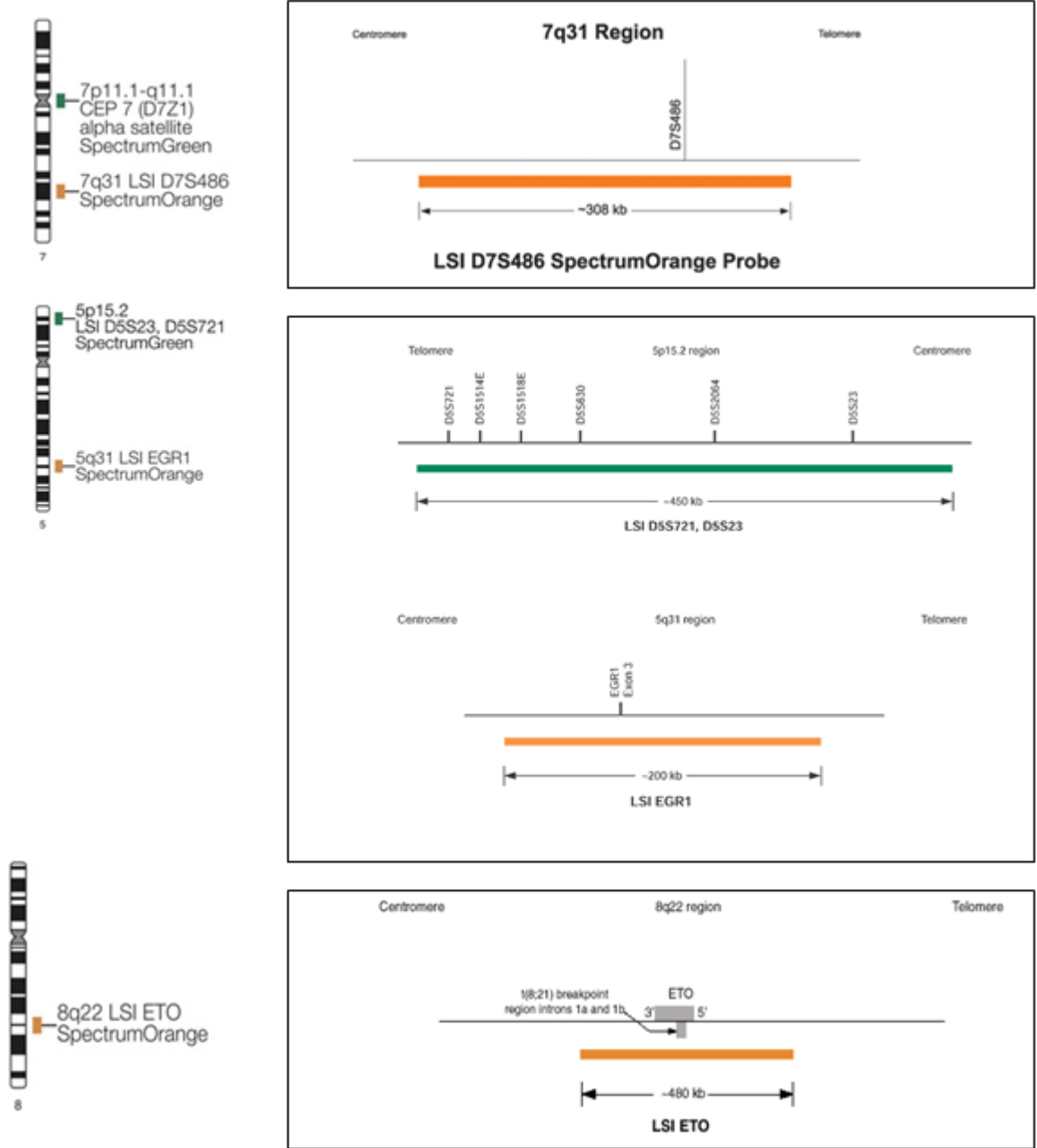


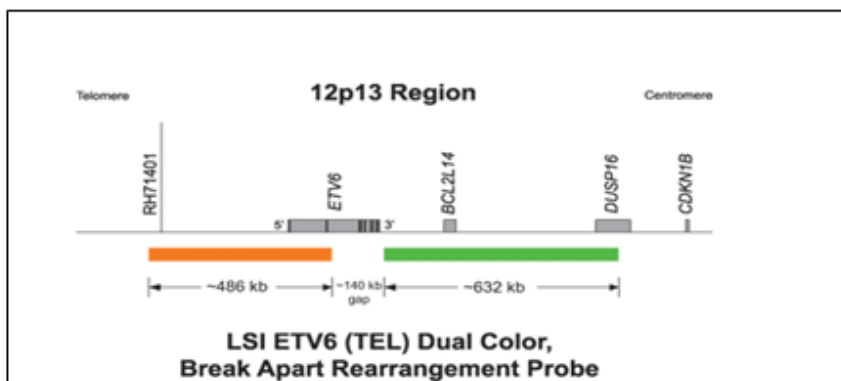
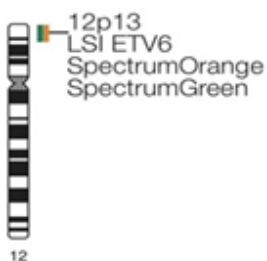
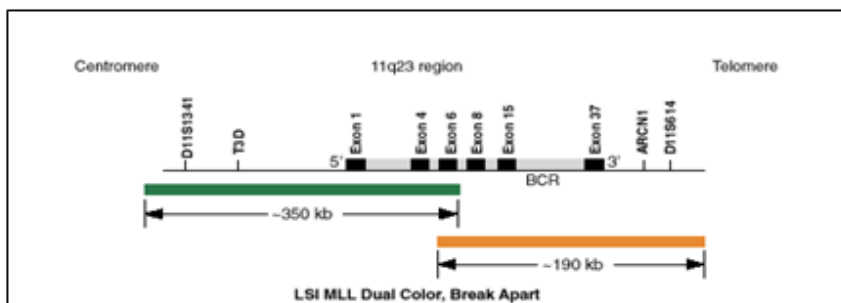
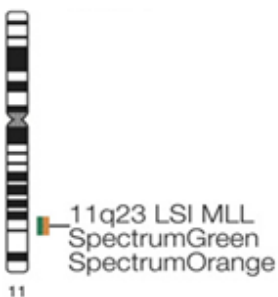
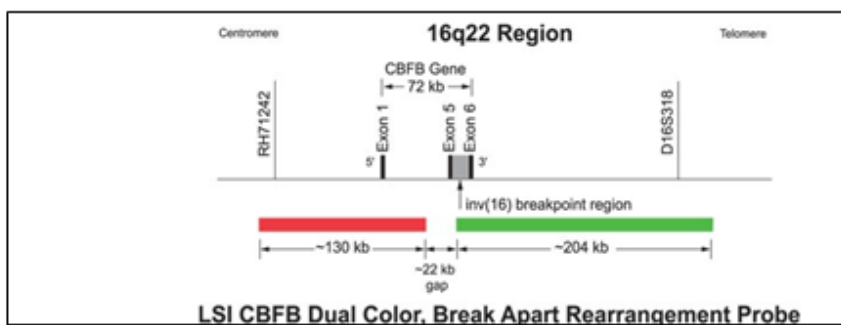
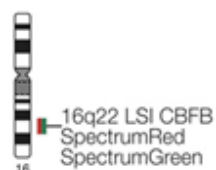
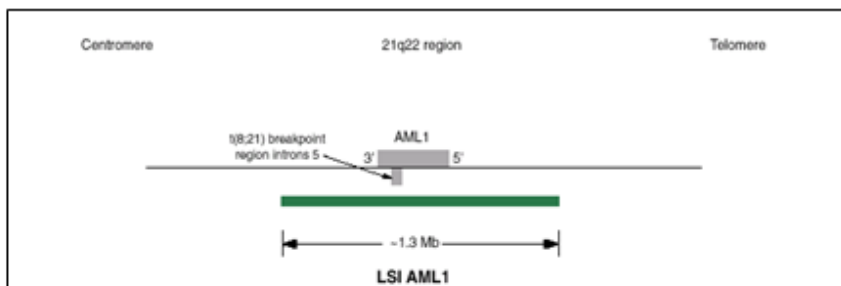


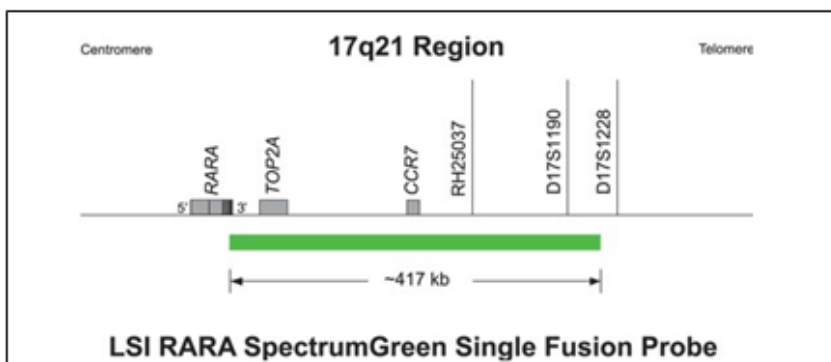
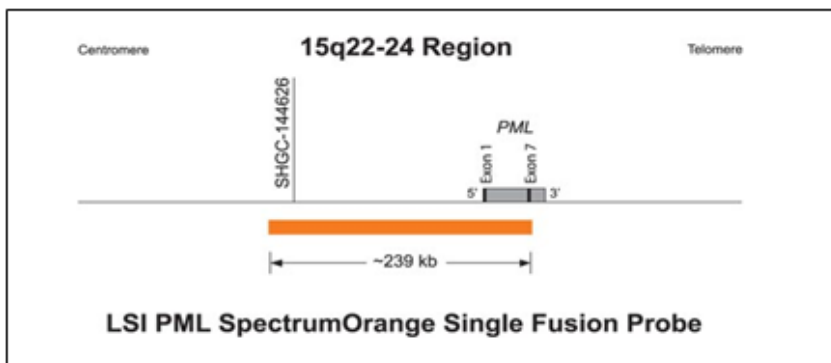


Tiré de www.abbottmolecular.com

ANNEXE 2 : LOCALISATION DES DIFFÉRENTES SONDES UTILISÉES DANS LE PANEL DES LEUCÉMIES MYÉLOIDES AIGUËS EN FISH







Tiré de www.abbottmolecular.com

CURRICULUM VITAE

Riwa Absi

Formation académique

Maîtrise en Cytogénétique	2008-présent
Sciences Biomédicales, Université de Montréal, Hospital Ste Justine, Montréal	
Baccalauréat en Biologie: Majeur en Biologie, Mineur en études hispaniques- distinction	2003-2007
Université McGill, Montréal	
Baccalauréat Français- mention Bien	1988-2003
Lycée Charles de Gaulle, Damascus, Syria	

Présentations orales

- **Caractérisation d'une anomalie chromosomique impliquant *MYB*, *GATA1* et *HDAC6* dans la leucémie aiguë myéloïde.** Absi R, Larose J, Lemyre E, Bouron-Dal Soglio D, Fetni R, XXIV^e congrès annuel des étudiants gradués et post-gradués du Centre de recherche du CHU Ste-Justine, juin 2009, Montréal
- **Caractérisation d'une anomalie chromosomique impliquant *MYB*, *GATA1* et *HDAC6* dans la leucémie aiguë myéloïde.** Absi R, Larose J, Lemyre E, Bouron-Dal Soglio D, Fetni R , 26^e réunion annuelle de l'Association de Cytogénétique du Québec, avril 2009, Québec
- **Réarrangement impliquant les bandes 6q23 et Xp11.23 chez des jumelles identiques avec leucémie aiguë non-lymphoblastique.** Absi R, Bouron-Dal Soglio D., Champagne M., Fournet J.C., Lemyre E, Fetni R., 25^e journée scientifique du département de Pathologie et Biologie Cellulaire, octobre 2008, Montréal
- **Identification of the breakpoints at 6q23 and Xp11.23 in a case of infant twins with acute non-lymphoblastic leukemia: a cytogenetic evidence of an intrauterine origin and possible involvement of *C-MYB*.** Absi R, Bouron-Dal Soglio D., Champagne M., Fournet J.C., Lemyre E, Fetni R., 46^e réunion annuelle du "Great lakes Chromosome Conference", Mai 2008, Toronto
- **Réarrangements acquis des bandes chromosomiques 6q23 et Xp11.2 chez des jumelles nourrissons: une évidence cytogénétique d'une origine prénatale de la leucémie myéloïde aiguë.** Absi R, Masson S, Montreuil L, Bordeleau L, Turmel D, Moghrabi A, Champagne M, Barette S, Lemyre E, Fetni R., 25^e réunion annuelle de l'Association de Cytogénétique du Québec, avril 2008, Montréal

Présentations par affiches

- **Stratégie de récolte de mitoses pour tout type de tumeur solide** Turmel D, Absi R, Bouron-Dal soglioD, Fetni R. ,26^e réunion annuelle de l'Association de Cytogénétique du Québec, avril 2009, Québec
- **High Frequency of Chromosome 11 Loss in Embryonal Rhabdomyosarcoma Detected by SNP Array Tumoral Genotyping** Bouron-Dal Soglio D, Rougemont AL, Absi R, Barrette S, Fetni R, Montpetit A, Oligny L, Fournet JC. 98^e réunion annuelle de l'Académie Canadienne et Américaine de Pathologie, Mars 2009, Boston

-A unique and surprising rearrangement of *EWSR1* in a case of malignant rhabdoid tumor with an homozygous deletion of *INI1* in association with a translocation t(1;22)(p36;q11.2) Bouron-Dal Soglio D, Absi R, Bouchard S, Fournet JC, Fetni R., 11^e atelier de cytogénétique et génétique moléculaire des tumeurs solides, Septembre 2008, Bilbao, Espagne

-Un cas unique de réarrangement de *EWSR1* dans un cas de tumeur rhabdoïde avec délétion bi-allélique de *INI1* associée à une translocation t(1;22)(p36;q11.2) Bouron-Dal Soglio D, Absi R, Bouchard S, Fournet JC, Fetni R. 25^e réunion annuelle de l'Association de Cytogénétique du Québec, avril 2008, Montréal

-Acquired rearrangements of chromosome bands 6q23 and xp11.23 in infant twins : cytogenetic evidence of an intrauterine origin of acute myeloid leukemia Absi R, Moghrabi A, Champagne M, Barette S, Fetni R. 33^e réunion annuelle de l'Association des Technologistes Génétiques, juin 2008, Houston

Résumés et articles publiés

-A unique and surprising rearrangement of *EWSR1* in a case of malignant rhabdoid tumor with an homozygous deletion of *INI1* in association with a translocation t(1;22)(p36;q11.2), Bouron-Dal Soglio D, Absi R, Bouchard S, Fournet JC, Fetni R. Résumé publié dans *Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology*; vol 12 , suppl 1, 2008

-SNP genotyping of a sclerosing rhabdomyosarcoma : specific aneuploid profile and *MDM2/HMGA2* amplification, Bouron-Dal Soglio D, Rougemont AL, Absi R, Barrette S, Montpetit A, Fetni R, Fournet JC. *Human Pathology*;40(9):1347-52, Sep 2009

- Beta-catenin mutation does not seem to have an impact in the tumorigenesis of pediatric rhabdomyosarcoma, Bouron-Dal Soglio D, Rougemont AL, Absi R, Giroux DL, Sanchez R, Barrette DS, Fournet JC. *Pediatric and Developmental Pathology*; 12(5):371-3, Sep-Oct 2009

Article en préparation

- Identification of the breakpoints at 6q23.3 and Xp11.23 in a case of infant twins with acute non-lymphoblastic leukemia: a cytogenetic evidence of an intrauterine origin and possible involvement of *MYB* and *GATA-1*, Absi R, Bouron-Dal Soglio D, Champagne M, Fournet JC, Lemyre E, Fetni R.

Bourses et prix

-Bourse de Sciences Biomédicales, Université de Montréal, Montréal

2009

-Mention spéciale à la 25^e journée scientifique du département de

2008

Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Montréal