

Université de Montréal

**Caractérisation clinique et moléculaire de nouvelles translocations
chromosomiques ciblant le gène *RUNXI* dans les leucémies aiguës de
l'adulte**

Amélie Giguère

Thèse présentée à :

La Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de

Ph.D en sciences biomédicales

Mai 2012

© Amélie Giguère, 2012

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Caractérisation clinique et moléculaire de nouvelles translocations chromosomiques ciblant
le gène *RUNXI* dans les leucémies aiguës de l'adulte

Présentée par :

Amélie Giguère

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Luigina Mollica, président-rapporteur

Dre Josée Hébert, directeur de recherche

Dre Frédérique Tihy, membre du jury

Dr Jean Soulier, examinateur externe

Dr Louis Gaboury, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La leucémie aiguë myéloïde est une hémopathie maligne génétiquement hétérogène caractérisée par de fréquents réarrangements impliquant la bande chromosomique 21q22 et le gène *RUNX1*. Dans ce groupe d'anomalies, les translocations t(8;21)(q22;q22) et t(3;21)(q26;q22), associées respectivement à un pronostic favorable et défavorable, sont les mieux étudiées. Or, plus de la moitié des réarrangements ciblant *RUNX1* ne sont toujours pas caractérisés au niveau clinique et moléculaire. Les principaux objectifs de cette thèse sont de caractériser quatre nouvelles translocations ciblant *RUNX1* et d'étudier la dérégulation transcriptionnelle associée à ces anomalies au niveau de cibles plus spécifiques ayant un rôle dans l'auto-renouvellement ou dans la différenciation hématopoïétique.

À l'aide des techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire, deux nouveaux partenaires de *RUNX1*, soit *CLCA2* et *SV2B*, ont été identifiés au sein des t(1;21)(p22.3;q22) et t(15;21)(q26.1;q22) et la récurrence des partenaires *USP42* et *TRPS1* a été démontrée suite à l'étude des t(7;21)(p22.1;q22) et t(8;21)(q23.3;q22). Ce travail a permis de confirmer l'existence de divers modes de dérégulation de *RUNX1* dans les leucémies aiguës. L'expression présumée de protéines chimériques et/ou d'isoformes tronquées de *RUNX1*, un dosage aberrant des transcrits de *RUNX1* et la surexpression des gènes partenaires sont des conséquences révélées par l'étude de ces fusions. Le séquençage et l'analyse des jonctions génomiques des fusions récurrentes *RUNX1-USP42/USP42-*

RUNXI et *RUNXI-TRPS1/TRPS1-RUNXI* ont démontré la présence de signatures moléculaires caractéristiques du mode de recombinaison non-homologue de type NHEJ. En raison de la structure et de la composition différente des jonctions, l'implication de composantes distinctes du mécanisme NHEJ a été proposée. Enfin, des analyses par PCR quantitative en temps réel nous ont permis de démontrer l'existence de cibles de dérégulation partagées par les fusions récurrentes et plus rares de *RUNXI*. Nous avons démontré que *CEBPA* est moins exprimé dans la majorité des spécimens étudiés présentant une fusion de *RUNXI* par rapport aux spécimens avec un caryotype normal alors que *JUP*, une composante effectrice de la voie Wnt, est plutôt surexprimé. Malgré l'activation transcriptionnelle de *JUP* dans l'ensemble de ces spécimens, certaines cibles de la voie Wnt telles que *CCND1* et *MYC* sont différemment exprimées dans ces cellules, appuyant l'hétérogénéité décrite dans ce groupe de leucémies.

Malgré l'implication de partenaires variés, nos données d'expression démontrent que les chimères et les protéines tronquées de *RUNX1* partagent des cibles communes d'activation et de répression transcriptionnelle et établissent, pour la première fois, des évidences moléculaires suggérant l'existence de similitudes entre la fusion récurrente *RUNXI-RUNX1T1* et quatre fusions plus rares de *RUNXI*. Puisque des rechutes surviennent fréquemment dans ce groupe génétique, l'inhibition de *JUP* pourrait être une option thérapeutique intéressante et ceci est appuyé par les bénéfices observés lors de l'inhibition de la voie Wnt dans d'autres groupes génétiques de leucémies aiguës.

Mots-clés : *RUNXI*, leucémie aiguë, NHEJ, *JUP*, *CEBPA*

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a genetically heterogeneous disease characterized by frequent rearrangements of the *RUNX1* gene located at chromosomal band 21q22. In this subtype of leukemias, t(8;21)(q22;q22) and t(3;21)(q26;q22) translocations are among the most studied rearrangements, being respectively associated with a favourable and poor prognosis. However, approximately half of *RUNX1* translocations remain uncharacterized at the clinical and molecular levels at the present time. The main objectives of this thesis are to characterize four novel *RUNX1* translocations in adult patients with acute leukemias and to study the expression profiles of specific transcriptional targets of *RUNX1* fusions involved in self-renewal or differentiation of hematopoietic cells.

Using molecular techniques, we identified *CLCA2* and *SV2B* genes as novel fusion partners of *RUNX1* in t(1;21)(p22;q22) and t(15;21)(q26;q22) translocations. We also described the recurrence of the *USP42* and *TRPS1* genes involved in t(7;21)(p22;q22) and t(8;21)(q23.3;q22) translocations. Chimeric fusion proteins, truncated isoforms of *RUNX1*, alteration of *RUNX1* transcripts expression and overexpression of the fusion partner were possible outcomes of these various fusions, thus demonstrating the diversity of *RUNX1* alterations in acute leukemias. Genomic breakpoints of the recurrent *RUNX1-UPS42/USP42-RUNX1* and *RUNX1-TRPS1/TRPS1-RUNX1* fusions were cloned and analyzed revealing typical signatures of the non-homologous end joining recombination mechanism at fusion junctions. Since variation in the structure and composition of these junctions was observed, we proposed that distinct cellular machineries would be involved

in the genesis of these abnormalities. Quantitative real-time PCR was performed on primary leukemic cells expressing these rare *RUNXI* fusions. We demonstrated, for the first time, that similar downregulation of *CEBPA* and upregulation of *JUP*, an effector of the Wnt pathway, are detected in most samples studied presenting either recurrent or rare *RUNXI* fusions. Despite an overexpression of *JUP* detected in each *RUNXI* positive sample studied, other targets of the Wnt pathway like *CCND1* and *MYC* genes were differently expressed in these cells, thus confirming the heterogeneity of this group of leukemias.

Our expression data show that similar transcriptional targets, activated or repressed, are detected in cells expressing either chimeric or truncated *RUNXI* proteins and establish the first molecular evidences suggesting that the recurrent *RUNXI-RUNXIT1* and four rare *RUNXI* fusions share common molecular deregulations. As relapse frequently occurs in *RUNXI* positive leukemias, *JUP* overexpression could be of particular interest with regard to targeted-therapy, as demonstrated by previous work showing potential benefits of inhibiting the Wnt pathway in other genetic groups of acute leukemias.

Keywords : *RUNXI*, acute leukemia, NHEJ, *JUP*, *CEBPA*

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	<u>II</u>
ABSTRACT	<u>III</u>
TABLE DES MATIÈRES	<u>IV</u>
LISTE DES TABLEAUX	<u>XX</u>
LISTE DES FIGURES	<u>XIIX</u>
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES	<u>XVIXVI</u>
REMERCIEMENTS	<u>XXIXXI</u>
CHAPITRE 1	<u>11</u>
1.1. L'HÉMATOPOÏÈSE NORMALE	<u>11</u>
1.1.1 Ontogénie de l'hématopoïèse.....	<u>11</u>
1.1.2 Cellules souches hématopoïétiques (CSH), progéniteurs et cellules matures	<u>33</u>
1.1.3 Le microenvironnement ou niche des CSH.....	<u>55</u>
1.1.4 Régulation de l'hématopoïèse.....	<u>66</u>
1.2. LA LEUCÉMIE : UN CANCER DES CELLULES DU SANG	<u>88</u>
1.2.1 Incidence et pronostic.....	<u>99</u>
1.2.2 Facteurs de risque des cancers hématologiques.....	<u>1010</u>
1.3 CLASSIFICATION ET GENETIQUE DES LEUCEMIES AIGUËS	<u>1111</u>
1.3.1 Génétique des LAM de novo.....	<u>1212</u>
1.3.2. Génétique des néoplasies myéloïdes secondaires à la chimiothérapie.....	<u>1313</u>
1.3.3 Génétique des LAL de novo de la lignée B	<u>1414</u>
1.3.4 Génétique des leucémies aiguës à phénotype mixte « MPAL »	<u>1616</u>
1.4. L'HÉMATOPOÏÈSE LEUCÉMIQUE : L'IMPORTANCE DE LA CELLULE SOUCHE LEUCÉMIQUE	<u>1717</u>
1.5. RUNX1 « RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 1 »	<u>2020</u>
1.5.1 RUNX1, un maître régulateur de l'hématopoïèse.....	<u>2020</u>
1.5.2 Étude des fonctions de RUNX1 par les modèles murins	<u>2626</u>
1.6 ANOMALIES GÉNÉTIQUES RÉCURRENTES IMPLIQUANT RUNX1	<u>3232</u>
1.6.1 La translocation t(12;21)(p13;q22) et la fusion ETV6-RUNX1.....	<u>3434</u>
1.6.2 La translocation t(8;21)(q22;q22) et la fusion RUNX1-RUNX1T1/ETO	<u>4141</u>
1.6.3 La translocation t(3;21)(q26;q22) et la fusion RUNX1-MECOM/MDS1-EVII	<u>4747</u>

1.6.4 Mutations et haploinsuffisance de RUNX1	5353
1.7. ÉTIOLOGIE DES RÉARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES	5555
1.7.1 Proximité spatiale.....	5656
1.7.2 Stress cellulaire	5858
1.7.3 Réparation erronée de l'ADN.....	5959
1.7.4 Motifs de l'ADN.....	6363
CHAPITRE 2.....	7171
2.1 CYTOGÉNÉTIQUE STANDARD ET MOLÉCULAIRE.....	7171
2.1.1 Établissement du caryotype en bandes GTG	7171
2.1.2 Le caryotype spectral (SKY)	7575
2.1.3 L'hybridation in situ en fluorescence (FISH)	7878
2.1.4 L'extraction de l'ADN de BACs.....	8080
2.1.5 Marquage par déplacement de coupures.....	8282
2.1.6 FISH avec des sondes BACs	8484
2.1.7 Marquage des sondes fosmidés avec la biotine	8484
2.1.8 FISH avec des sondes fosmidés	8585
2.2 EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES	8989
2.2.1 Extraction des ARN totaux par le TRIzol™.....	8989
2.2.2 Extraction de l'ADN génomique par la technique phénol/chloroforme	9090
2.3 SYNTHÈSE DE L'ADNC.....	9191
2.3.1 Synthèse d'ADNc selon le protocole d'Invitrogen.....	9191
2.3.2 Synthèse d'ADNc selon le protocole d'ABI	9292
2.4 « POLYMERASE CHAIN REACTION » OU PCR ET VARIANTES.....	9292
2.4.1. PCR à haute fidélité selon Qiagen.....	9393
2.4.2 PCR à haute fidélité selon Invitrogen.....	9393
2.4.2 La « reverse transcriptase-PCR » (RT-PCR)	9595
2.4.2.1 RT-PCR selon Qiagen.....	9595
2.4.2.2 RT-PCR selon Invitrogen.....	9696
2.4.3 Technique de RACE PCR selon Invitrogen	9898
2.5 EXTRACTION, CLONAGE DE L'ADNC ET SÉQUENÇAGE	100100
2.5.1. Extraction de l'ADNc d'un gel d'agarose	100100
2.5.2 Clonage des produits PCR (vecteur pGEM-T Easy).....	101101
2.5.3 Méthode Sanger de séquençage.....	103103
2.6 PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL (QRT-PCR).....	104104

2.7 ANALYSE PROTÉIQUE	<u>108108</u>
2.7.1 Cytospin.....	<u>108108</u>
2.7.2 Fixation et immunofluorescence.....	<u>108108</u>
2.7.3 Extraction de protéines.....	<u>109109</u>
2.7.4 Western blot.....	<u>111111</u>
CHAPITRE 3.....	<u>114114</u>
3.1 PARAMÈTRES CLINIQUES DU CAS 04H120	<u>114114</u>
3.2 ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE	<u>115115</u>
3.2.1 Identification du point de cassure sur le gène <i>RUNX1</i>	<u>117117</u>
3.2.2 Identification du gène partenaire de la <i>t(7;21)(p22;q22)</i> : <i>USP42</i>	<u>119119</u>
3.3 IDENTIFICATION DES TRANSCRITS DES FUSIONS <i>RUNX1-USP42</i> ET <i>USP42-RUNX1</i>	<u>121121</u>
3.3.1 Analyse des transcrits de la fusion principale <i>RUNX1-USP42</i>	<u>121121</u>
3.3.2 Analyse du transcrit de la fusion réciproque <i>USP42-RUNX1</i>	<u>127127</u>
3.4 IDENTIFICATION DE LA JONCTION GÉNOMIQUE DES FUSIONS <i>RUNX1-USP42</i> ET <i>USP42-RUNX1</i> ..	<u>128128</u>
3.4.1 Analyse de la jonction génomique de la fusion principale <i>RUNX1-USP42</i>	<u>128128</u>
3.4.2 Analyse de la jonction génomique de la fusion réciproque <i>USP42-RUNX1</i>	<u>131131</u>
3.5 <i>USP42</i> , UNE « UBIQUITIN SPECIFIC PEPTIDASE » PEU CONNUE.....	<u>134134</u>
3.6 ÉVALUATION DE L'INCIDENCE DE LA FUSION <i>RUNX1-USP42</i> DANS LES CANCERS HÉMATOLOGIQUES	
.....	<u>136136</u>
3.6.1 Incidence de la fusion <i>RUNX1-USP42</i> dans les néoplasies hématologiques	<u>137137</u>
3.6.2 Analyse quantitative de l'expression de <i>USP42</i> dans divers spécimens de néoplasies	
hématologiques.....	<u>139139</u>
3.6.3 Analyse différentielle de l'expression de l'allèle <i>USP42</i> sauvage et de l'allèle <i>USP42</i> réarrangé	
.....	<u>147147</u>
3.7 ÉTUDE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DES CHIMÈRES DE FUSION <i>RUNX1-USP42</i> PAR	
IMMUNOFUORESCENCE.....	<u>148148</u>
3.8 ÉTUDE D'EXPRESSION DE LA PROTÉINE DE FUSION <i>RUNX1-USP42</i> PAR WESTERN BLOT	<u>153153</u>
3.9 MÉCANISMES DE LEUCÉMOGÈNE PROPOSÉS POUR LA FUSION <i>RUNX1-USP42</i>	<u>155155</u>
CHAPITRE 4.....	<u>161161</u>
4.1 PARAMÈTRES CLINIQUES DU CAS 07-0893.....	<u>161161</u>
4.2 ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE	<u>163163</u>
4.2.1 Identification du point de cassure sur le gène <i>RUNX1</i>	<u>163163</u>
4.2.2 Identification du gène partenaire de la <i>t(1;21)(p22;q22)</i> : <i>CLCA2</i>	<u>166166</u>

4.3 IDENTIFICATION DES TRANSCRITS DE FUSION <i>RUNX1-CLCA2</i> ET <i>CLCA2-RUNX1</i>	169169
4.3.1 Analyse des transcrits de la fusion principale <i>RUNX1-CLCA2</i>	169169
4.3.2 Étude de la fusion réciproque <i>CLCA2-RUNX1</i>	175175
4.3.3 Analyse mutationnelle du gène <i>RUNX1</i>	176176
4.4 DISTINCTION ENTRE LEUCÉMIE EN RECHUTE ET LEUCÉMIE SECONDAIRE À UNE CHIMIOTHÉRAPIE ANTÉRIEURE	176176
4.5. <i>CLCA2</i> , UN POSSIBLE GENE SUPPESSEUR DE TUMEUR	179179
4.5 EXPRESSION DE <i>CLCA2</i> DANS LES CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES NORMALES ET LEUCÉMIQUES ...	182182
4.6 MÉCANISMES DE LEUCÉMOGÈNESE PROPOSÉS POUR LA FUSION <i>RUNX1-CLCA2</i>	187187
CHAPITRE 5	193193
5.1 PARAMÈTRES CLINIQUES CAS 10H006	193193
5.2 ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE	196196
5.2.1 Identification du point de cassure sur le gène <i>RUNX1</i> et étude du gène partenaire	196196
5.3 IDENTIFICATION DES TRANSCRITS DES FUSIONS <i>RUNX1-TRPS1</i> ET <i>TRPS1-RUNX1</i>	197197
5.3.1 Identification du gène partenaire de la <i>t(8;21)(q23.3;q22)</i> , <i>TRPS1</i> , et analyse des transcrits de la fusion principale <i>RUNX1-TRPS1</i>	197197
5.3.2 Analyse des transcrits de la fusion réciproque <i>TRPS1-RUNX1</i>	200200
5.4 IDENTIFICATION DES JONCTIONS GÉNOMIQUES DES FUSIONS <i>RUNX1-TRPS1</i> ET <i>TRPS1-RUNX1</i> ...	202202
5.4.1 Analyse des jonctions génomiques des fusions <i>RUNX1-TRPS1</i> et <i>TRPS1-RUNX1</i>	202202
5.4 <i>TRPS1</i> , UN MEMBRE UNIQUE DE LA FAMILLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION GATA	208208
5.5 EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DE L'ALLÈLE SAUVAGE ET DE L'ALLÈLE RÉARRANGÉ DE <i>TRPS1</i>	211211
5.6 MÉCANISMES DE LEUCÉMOGÈNESE PROPOSÉS POUR LA FUSION <i>RUNX1-TRPS1</i>	214214
CHAPITRE 6	218218
6.1 PARAMÈTRES CLINIQUES DU CAS 08H131	218218
6.2 ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE	220220
6.2.1 Identification du point de cassure sur le gène <i>RUNX1</i>	220220
6.2.2 Identification du gène partenaire de la <i>t(15;21)(q2?6;q22)</i>	223223
6.3 ÉTUDE DES TRANSCRITS DE FUSION <i>RUNX1-SV2B</i>	227227
6.4 LE GÈNE <i>SLCO3A1</i> , UN TRANSPORTEUR SOLUBLE DES IONS ORGANIQUES	234234
6.5 ÉTUDES D'EXPRESSION DU GÈNE <i>SLCO3A1</i> DANS LES TISSUS HÉMATOPOÏÉTIQUES NORMAUX ET LEUCÉMIQUES	235235
6.6 <i>SV2B</i> , UNE GLYCOPROTÉINE DES VÉSICULES SYNAPTIQUES	241241

6.7 ÉTUDE D'EXPRESSION DE <i>RUNX1</i> DANS LES TISSUS HÉMATOPOÏÉTIQUES NORMAUX ET LEUCÉMIQUES	<u>242242</u>
6.8 MÉCANISMES DE LEUCÉMOGÈNESE PROPOSÉS POUR LA FUSION <i>RUNX1-SV2B</i>	<u>246246</u>
7. PROFIL D'EXPRESSION DES CIBLES DES FUSIONS <i>RUNX1</i>	<u>252252</u>
7.1 ÉTUDES D'EXPRESSION DES GÈNES <i>CEBPA</i> ET <i>CRT</i> DANS LES LEUCÉMIES PRIMAIRES ET LIGNÉES DE CANCERS HÉMATOLOGIQUES	<u>252252</u>
7.2 ÉTUDES D'EXPRESSION DES PROTÉINES SPI1, <i>CEBPA</i> ET <i>CRT</i> DANS LES LEUCÉMIES PRIMAIRES ET LIGNÉES DE CANCERS HÉMATOLOGIQUES	<u>262262</u>
7.3 ÉTUDE D'EXPRESSION DES COMPOSANTES DE LA VOIE WNT DANS LES LIGNÉES DE CANCERS HÉMATOLOGIQUES ET LES LEUCÉMIES PRIMAIRES AVEC ANOMALIES DE <i>RUNX1</i>	<u>269269</u>
8. DISCUSSION GÉNÉRALE	<u>279279</u>
8.1 UN LARGE SPECTRE DE PARTENAIRES IDENTIFIÉS	<u>280280</u>
8.1.1 <i>Les facteurs de transcription, la classe majoritaire des partenaires de RUNX1</i>	<u>282282</u>
8.1.2 <i>Les enzymes de déubiquitination, une famille récurrente de partenaires</i>	<u>287287</u>
8.1.3 <i>Les protéines membranaires, une classe émergente de partenaires</i>	<u>290290</u>
8.2 PREMIER SYSTÈME DE CLASSIFICATION DES PARTENAIRES DE <i>RUNX1</i>	<u>292292</u>
8.3 IMPLICATION DU MÉCANISME NHEJ DANS LES TRANSLOCATIONS T(7;21)(P22;Q22) ET T(8;21)(Q23.3;Q22)	<u>295295</u>
8.3.1 <i>Voie classique versus voie alternative du NHEJ</i>	<u>305305</u>
8.4 ÉTUDE DES CIBLES DES FUSIONS <i>RUNX1</i>	<u>306306</u>
8.4.1 <i>La voie Wnt dans les leucémies présentant un réarrangement de RUNX1</i>	<u>308308</u>
9. CONCLUSION	<u>319319</u>
10. ANNEXE A : TABLEAUX SUPPLEMENTAIRES	<u>II</u>
11. ANNEXE B : ARTICLE 1	<u>XIVXIV</u>
12. ANNEXE C : ARTICLE 2	<u>XVXV</u>
BIBLIOGRAPHIE	<u>XVIXVI</u>

LISTE DES TABLEAUX

Table 1.1. Fréquence et survie globale à 10 ans des principales anomalies génétiques des leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte âgé entre 16 et 59 ans.	13
Table 1.2. Fréquence et survie globale à 5 ans des principales anomalies génétiques des leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée B de l'enfant âgé entre 1 et 18 ans.	15
Table 1.3. Fréquence et survie globale à 5 ou 10 ans des principales anomalies génétiques des leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée B de l'adulte âgé entre 15 et 65 ans. .	16
Table 1.4. Phénotypes des différents modèles murins (embryonnaires et adultes) avec délétions homozygotes (-/-) ou hétérozygotes (+/-) de <i>Runx1</i>	32
Table 2.1. Sondes ayant servi à l'identification des translocations étudiées au cours de ce projet.	80
Table 2.2. Sondes « bacterial artificial chromosomes » (BACs) et fosmidés utilisées lors de la caractérisation des t(7;21)(p22.1;q22), t(1;21)(p22.3;q22) et t(15;21)(q26.1;q22).	88
Table 2.3. Séquences des oligonucléotides ayant servi à l'amplification des jonctions génomiques des gènes de fusion <i>RUNX1-USP42</i> et <i>USP42-RUNX1</i>	94
Table 2.4. Séquences des oligonucléotides ayant servi à l'amplification des jonctions génomiques des gènes de fusion <i>RUNX1-TRPS1</i> et <i>TRPS1-RUNX1</i>	94
Table 2.5. Séquences des oligonucléotides ayant servi à l'étude, à l'amplification et au clonage des gènes de fusion <i>RUNX1-USP42/USP42-RUNX1</i> , <i>RUNX1-CLCA2/CLCA2-RUNX1</i> , <i>RUNX1-TRPS1/TRPS1-RUNX1</i> et <i>RUNX1-SV2B</i>	97
Table 2.6. Séquences des oligonucléotides ayant servi à l'étude et/ou à l'amplification des transcrits de fusion <i>RUNX1-SV2B</i>	99
Table 2.7. Gènes étudiés par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) à l'aide de divers essais Taqman.	106
Table 2.8. Lignées de cancers hématologiques.	110
Table 2.9. Caractéristiques morphologiques et caryotypes des quatre spécimens de leucémies primaires utilisés pour les études protéiques.	111

Table 2.10. Anticorps utilisés pour les études d'immunofluorescence et de western blot.	112
Table 3.1. Caractéristiques des sept spécimens rapportés dans la littérature présentant une t(7;21)(p22;q22) et une fusion <i>RUNX1-USP42</i>	137
Table 3.2. Sous-expression du gène <i>USP42</i> dans les néoplasies hématologiques.	146
Table 3.3. Surexpression du gène <i>USP6</i> dans les leucémies myéloïdes de l'adulte (LAM).	159
Table 4.1. Déduction de la taille en acides aminés des protéines tronquées prédites de RUNX1 résultant des six transcrits alternatifs de fusion <i>RUNX1-CLCA2</i> (T1 à T6).	173
Table 4.2. Diagnostics morphologiques et caryotypes des 21 échantillons leucémiques sélectionnés pour l'étude d'expression de <i>CLCA2</i>	184
Table 4.3. Translocations menant à l'expression de protéines tronquées de RUNX1 « out- of-frame » ou à la co-expression de protéines tronquées et de protéines chimériques de RUNX1 « in-frame et out-of-frame ».	189
Table 6.1. Sondes BACs et fosmidés utilisées afin d'identifier les deux régions de cassures aux bandes chromosomiques 21q22 et 15q26.1.	224
Table 6.2. Caryotypes des neuf spécimens de leucémie aiguë à phénotype mixte étudiés par hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.	236
Table 6.3. Valeurs de quantification relative spécifique à chaque essai et à chacun des patients étudiés.	240
Table 7.1. Valeurs moyennes de quantification relative obtenues pour les gènes <i>CEBPA</i> , <i>CRT</i> , <i>JUP</i> et <i>MYC</i> étudiés dans chacun des quatre principaux groupes de leucémies de l'étude préliminaire.	256
Table 7.2. Valeurs moyennes de quantification relative obtenues pour les gènes <i>CEBPA</i> , <i>CRT</i> , <i>JUP</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>MYC</i> et <i>CCND1</i> pour chacun des quatre principaux groupes de leucémies analysés dans l'étude de validation.	273
Table 8.1. Classification des 57 loci génomiques réarrangés avec <i>RUNX1</i>	294

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Hiérarchie du système hématopoïétique.	4
Figure 1.2. Évènements transformants possibles menant au développement de la leucémie aiguë myéloïde (LAM).	19
Figure 1.3. Représentation schématique des transcrits de <i>RUNX1</i> et de sa protéine.	21
Figure 1.4. Environnement transcriptionnel de <i>RUNX1</i>	24
Figure 1.5. Effet d'une délétion homozygote de <i>Runx1</i> dans l'hématopoïèse adulte.	31
Figure 1.6. Représentation schématique du gène de fusion <i>ETV6-RUNX1</i> , des protéines sauvages <i>ETV6</i> et <i>RUNX1</i> et de la chimère de fusion <i>ETV6-RUNX1</i>	36
Figure 1.7. Représentation schématique du gène de fusion <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , des protéines sauvages <i>RUNX1T1</i> et <i>RUNX1</i> et de la chimère de fusion <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	43
Figure 1.8. Représentation schématique des gènes <i>MDS1</i> et <i>EVII</i> sauvages, du gène de fusion <i>RUNX1-MECOM/MDS1-EVII</i> , des protéines <i>MECOM</i> , <i>EVII</i> et <i>RUNX1</i> sauvages et de la chimère de fusion <i>RUNX1-MECOM</i>	49
Figure 1.9. Quatre grandes catégories de stimuli pouvant induire des réarrangements chromosomiques.	56
Figure 1.10. Mécanisme d'action de la topoisomérase II (TOP2).	64
Figure 2.1. Positionnement des sondes « bacterial artificial chromosomes » par rapport au locus <i>RUNX1</i> localisé à la bande 21q22.12.	87
Figure 3.1. Analyse cytogénétique des cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient atteint de leucémie aiguë myéloïde sans maturation présentant la t(7;21)(p22;q22).	116
Figure 3.2. Analyse par hybridation <i>in situ</i> en fluorescence sur les chromosomes métaphasiques obtenus à partir des cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient présentant la t(7;21)(p22;q22).	118
Figure 3.3. Gel de bromure d'éthidium montrant les différents transcrits de fusion <i>RUNX1-USP42</i> amplifiés par RT-PCR, à partir de l'ARN total extrait des cellules mononuclées du patient avec la t(7;21)(p22;q22).	122

Figure 3.4. Analyse moléculaire des transcrits de fusion <i>RUNXI-USP42</i> et <i>USP42-RUNXI</i>	126
Figure 3.5. Jonctions d'ADN génomique des fusions <i>RUNXI-USP42</i> et <i>USP42-RUNXI</i> identifiées par PCR à partir de l'ADN génomique extrait des cellules mononuclées du patient présentant la t(7;21)(p22;q22).	130
Figure 3.6. Gel de bromure d'éthidium montrant l'absence d'amplification par RT-PCR de la fusion <i>RUNXI-USP42</i> dans les échantillons de néoplasies hématologiques étudiés. ...	139
Figure 3.7. Expression du gène <i>USP42</i> dans les néoplasies hématologiques.	142
Figure 3.8. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence sur les chromosomes métaphasiques obtenus à partir des cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient 09H026.	145
Figure 3.9. Profil d'expression de la région N-terminale de <i>RUNX1</i> dans les cellules primaires de patients leucémiques et/ou dans les lignées leucémiques.	151
Figure 3.10. Expression de <i>USP6</i> par RT-PCR dans les cellules primaires de deux moelles osseuses normales et de huit patients leucémiques sans ou avec surexpression du gène. .	158
Figure 4.1. Analyse cytogénétique des cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient atteint de leucémie myéloïde aiguë secondaire à une chimiothérapie antérieure (t-LAM) présentant la t(1;21)(p22;q22).	165
Figure 4.2. Position des BACs ciblant la bande chromosomique 1p22.3.	167
Figure 4.3. Analyse moléculaire des six transcrits alternatifs de la fusion <i>RUNXI-CLCA2</i>	171
Figure 4.4. Analyse des protéines de <i>RUNX1</i> tronquées prédites résultant de la t(1;21)(p22;q22) et des transcrits <i>RUNXI-CLCA2</i>	174
Figure 4.5. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence sur les cellules mononuclées de moelle osseuse du patient au diagnostic et au moment de sa leucémie secondaire à la chimiothérapie.	178
Figure 4.6. La protéine <i>CLCA2</i>	180
Figure 4.7. Expression du gène <i>CLCA2</i>	185
Figure 5.1. Analyse cytogénétique des cellules mononuclées de la moelle osseuse du spécimen de leucémie myéloïde aiguë en rechute présentant la t(8;21)(q23.3;q22).	195

Figure 5.2. Étude moléculaire des transcrits des fusions <i>RUNXI-TRPS1</i> et <i>TRPS1-RUNXI</i>	199
Figure 5.3. Gel de bromure d'éthidium montrant les produits d'amplification correspondant aux jonctions génomiques des fusions <i>RUNXI-TRPS1</i> et <i>TRPS1-RUNXI</i>	203
Figure 5.4. Analyse des points de cassures génomiques des fusions <i>RUNXI-TRPS1</i> et <i>TRPS1-RUNXI</i>	204
Figure 5.5. Représentation schématique du gène <i>TRPS1</i> et de la protéine TRPS1.	210
Figure 5.6. Expression différentielle des allèles de <i>TRPS1</i>	212
Figure 6.1. Analyse cytogénétique des cellules mononuclées isolées du sang périphérique de la patiente présentant une t(9;22)(q34;q11.2) et une t(15;21)(q26.1;q22).	219
Figure 6.2. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence des sondes ciblant le locus de <i>RUNXI</i> sur les chromosomes métaphasiques obtenus à partir des cellules mononuclées isolées du sang périphérique du spécimen présentant la t(15;21)(q26.1;q22).	222
Figure 6.3. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence des sondes BACs ciblant le locus 15q26.1 sur les chromosomes métaphasiques obtenus à partir des cellules mononuclées du sang périphérique de la patiente présentant la t(15;21)(q26.1;q22).	226
Figure 6.4. Modèle de la t(15;21)(q26.1;q22).	228
Figure 6.5. Migration sur gel d'agarose des produits d'amplification des techniques de 3'RACE PCR.	230
Figure 6.6. Séquences des transcrits de fusion <i>RUNXI-SV2B</i> identifiés par PCR sur l'ADN complémentaire du cas 08H131 présentant la t(15;21)(q26.1;q22).	232
Figure 6.7. Représentation schématique des points de cassure et des transcrits de fusion <i>RUNXI-SV2B</i> brin anti-sens.	233
Figure 6.8. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence sur les chromosomes métaphasiques de spécimens atteints de leucémie aiguë à phénotype mixte, à l'aide de la sonde RP11-615N7 ciblant les exons 3 à 9 du gène <i>SLCO3A1</i>	237
Figure 6.9. Expression du gène <i>SLCO3A1</i> dans les cellules de leucémies primaires, de sang normal et de lignées de cancers.	239
Figure 6.10. Positionnement des trois essais de PCR quantitative en temps réel.	243

Figure 6.11. Valeurs de « cycle threshold » (Ct) brutes obtenues pour les spécimens de leucémies aiguës à phénotype mixte (MPAL) et de moelles normales étudiés.	244
Figure 7.1. Valeurs de quantification relative obtenues pour les gènes <i>CEBPA</i> et <i>CRT</i> dans les cellules primaires de patients leucémiques, de lignées leucémiques et de moelles normales.	257
Figure 7.2. Expression des protéines SPI1, CEBPA et CRT dans les lignées leucémiques myéloïdes et lymphoïdes.	265
Figure 7.3. Expression des protéines CEBPA, CRT et SPI1 dans les cellules mononuclées isolées de spécimens primaires et de lignées de leucémie aiguë myéloïde.	267
Figure 7.4. Voie de signalisation canonique Wnt.	270
Figure 7.5. Expression de quatre composantes de la voie Wnt (<i>JUP</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>CCND1</i> et <i>MYC</i>) dans des leucémies primaires, lignées leucémiques et moelles normales.	275
Figure 8.1. Identification de cinq classes de partenaires des fusions <i>RUNX1</i>	292
Figure 8.2. Représentation schématique des points de cassures rapportés dans les introns 7a et 7b de <i>RUNX1</i>	297
Figure 8.3. Mécanisme proposé à l'origine des jonctions <i>RUNX1-TRPS1/TRPS1-RUNX1</i> et <i>RUNX1-USP42/USP42-RUNX1</i>	301
Figure 8.4. Schématisation de la protéine RUNX1 sauvage, des protéines de fusion et des protéines tronquées présumées engendrées lors des translocations ciblant <i>RUNX1</i>	307

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxiriboNucléique Complémentaire
AGM	Région Aorto-Gonado-Mésonéphros
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger
BAC	« Bacterial artificial chromosome »
BCLQ	Banque de Cellules Leucémiques du Québec
BCR	« Breakpoint Cluster Region »
CBF	« Core Binding Factor »
CBFB	Sous-unité bêta du « Core Binding Factor »
CLP	Progéniteur commun lymphoïde
CMP	Progéniteur commun myéloïde
CR	Domaine central de répression transcriptionnelle
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CSL	Cellule Souche Leucémique
Ct	« Cycle Threshold »
dNTP	désoxyribonucléotide
DSB	Bris double brin ou « Double Strand Break »
ETO	« Eight-Twenty-One »
ETS	« E-26 transformation-specific »
ETV6	« Ets variant 6 »
FAB	Classification « French-American-British »
FISH	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence
FPD	Syndrome plaquettaire familial ou « Familial Platelet Disorder »
GM-CSF	« granulocyte macrophage-colony stimulating factor »
GMP	Progéniteur granulocyte-macrophage
HDAC	Histone DéACétylase

HLH	Domaine « Helix-Loop-Helix »
IGH	chaîne lourde des immunoglobulines
ISCN	Système international de nomenclature de la cytogénétique humaine
kDa	kilodalton
kb	kilobase
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoïde
LAL-B	Leucémie Aiguë Lymphoïde de la lignée B
LAL-T	Leucémie Aiguë Lymphoïde de la lignée T
LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
LIC	« Leukemia-Initiating Cell »
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LMC-PB	Leucémie Myéloïde Chronique en Phase Blastique
LMMC	Leucémie MyéloMonocytaire Chronique
LPA	Leucémie Promyélocytaire Aiguë
LSK	Cellule Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺
LT-CSH	Cellule souche hématopoïétique avec potentiel de repopulation à long terme
M0	Leucémie aiguë myéloïde avec différenciation minimale
M1	Leucémie aiguë myéloïde sans maturation
M2	Leucémie aiguë myéloïde avec maturation
M3	Leucémie promyélocytaire aiguë
M4	Leucémie myélomonocytaire aiguë
M4Eo	Leucémie myélomonocytaire aiguë avec éosinophiles anormaux
M5	Leucémie monoblastique/monocytaire aiguë
M6	Leucémie érythrocytaire aiguë
M7	Leucémie mégacaryoblastique aiguë
MECOM	« MDS1 and EVI1 complex locus »
MEP	progéniteur mégacaryocyte/érythrocyte
MPAL	leucémie aiguë à phénotype mixte ou leucémie aiguë biphénotypique

MPP	progéniteur multipotent
NHEJ	Mécanisme de recombinaison de type jonction des extrémités non-homologues ou « Non-homologous End Joining »
NHR	Domaine « Nervy Homology Region »
NK	caryotype normal
NLS	signal de localisation nucléaire ou « Nuclear Localization Signal »
NMP	néoplasie myéloproliférative
NMTS	signal de localisation à la matrice nucléaire ou « Nuclear Matrix Targeting Signal »
p300	Histone acétyltransférase « E1A binding protein p300 »
pb	paire de base
PR	Domaine « PRD1-BF1 and RIZ homology »
RHD	« Runt Homology Domain »
rpm	révolution par minute
RQ	Quantification relative
RSS	« Recombination Signal Sequence »
RUNX1	« Runt related transcription factor 1 »
SKY	caryotype spectral
SMD	Syndrome myélodysplasique
SSC	citrate de sodium
SVF	sérum de veau foetal
TAD/ID	Domaine de régulation transcriptionnelle
TCR	Récepteur des cellules T ou « T-Cell Receptor »
TE	Sous-région d'activation transcriptionnelle
TOP2	ADN topoisomérase de type II
t-LAM	Leucémie aiguë myéloïde secondaire à une chimiothérapie antérieure
t-SMD/LAM	Syndrome myélodysplasique ou leucémie myéloïde aiguë secondaire à une chimiothérapie antérieure
UPL	Sonde « Universal Probe Library »

WHO classification du « World Health Organization »
ZF Motif en doigt de zinc

*À mon conjoint Jean-Philippe et à ma
famille,*

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier ma directrice de thèse, Dre Josée Hébert, de m'avoir permis de découvrir ce merveilleux domaine qu'est la cytogénétique. Lors de mon cheminement, vous avez su me communiquer votre passion pour les chromosomes et m'avez appris une méthode de travail et d'analyse structurée et rigoureuse qui me suivra tout au long de mon parcours futur en cytogénétique. Merci pour votre enseignement et pour tout le temps que vous m'avez accordé.

Merci à tous les membres, présents et passés, du laboratoire de recherche de la Banque de Cellules Leucémiques du Québec et du laboratoire clinique de cytogénétique de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont pour l'aide que vous m'avez apportée lors de la réalisation de mon projet de recherche. J'aimerais également remercier la Fondation Cole, l'Université de Montréal, la Fondation Mickael Jeffrey Cherbaka et les fonds de recherche de la Banque de Cellules Leucémiques de Québec pour l'aide financière qui m'a été accordée tout au long de ces années de formation.

Par-dessus tout, j'aimerais remercier mon conjoint Jean-Philippe d'avoir été à mes côtés et de m'avoir accompagnée à chaque étape de cette grande aventure. Merci de m'avoir encouragée à aller jusqu'au bout de mes ambitions.

À mon père Marcel, ma mère Micheline, mes soeurs Cynthia (et Nicolas) et Sophie (et Mikael) ainsi qu'à ma belle-famille (Irenée, Marjolaine, Marie-Hélène, Jean-François, Pierre-Alexandre et Julie) qui m'ont toujours encouragée et soutenue, un merci tout spécial.

CHAPITRE 1

1. Introduction

1.1. L'hématopoïèse normale

L'hématopoïèse est le processus de formation des cellules du sang par lequel les éléments matures des lignées myéloïdes et lymphoïdes sont générés à partir d'une population de cellules rares : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH se situent au sommet de la hiérarchie du système hématopoïétique et permettent d'initier et de maintenir ce système tout au long de la vie adulte.

1.1.1 Ontogénie de l'hématopoïèse

Le système hématopoïétique émerge d'abord d'une hématopoïèse primitive puis se maintient grâce à une hématopoïèse définitive qui assure une production continue des cellules matures du sang. Chez la souris, les cellules formant le système hématopoïétique (CSH, progéniteurs et cellules matures) apparaissent dans divers emplacements anatomiques extra-embryonnaires (sac vitellin ou « *yolk sac* », placenta, artères vitellines et ombilicales) et intra-embryonnaires (région aorto-gonado-mésonephros (AGM), foie fœtal et moelle osseuse). La première vague d'hématopoïèse, dérivant du sac vitellin, s'initie au jour embryonnaire E7.5 chez la souris et permet la production des premiers progéniteurs ainsi que des cellules primitives (érythrocytes, macrophages et mégacaryocytes) qui coloniseront le foie fœtal. L'hématopoïèse

primitive a principalement pour fonction de produire des érythrocytes primitifs nucléés qui assureront le transport de l'oxygène dans l'embryon grandissant.

Cette première étape est rapidement remplacée par la seconde vague d'hématopoïèse, laquelle apparaît dans la région AGM au jour embryonnaire E9.5-10.5 murin. Dans cette fenêtre de temps, les premières CSH vont émerger de l'endothélium hémogénique de la région AGM et de la paroi des artères ombilicales et vitellines adjacentes, proliférer puis se maintenir par auto-renouvellement (aptitude à générer une cellule fille équivalente à la cellule mère) grâce aux divisions symétriques (production de deux cellules identiques à la cellule mère) ou asymétriques (production d'une cellule identique à la cellule mère et d'une cellule différenciée) (Zovein et al., 2008; Chen et al., 2009; Gekas et al., 2010; Lam et al., 2010). Le placenta contribue également à l'émergence des CSH et à la colonisation des autres sites extra-embryonnaires (sac vitellin, artères vitellines et ombilicales) où une prolifération et une expansion des CSH embryonnaires sera observée (Orkin and Zon 2008; Gekas et al., 2010; Lee et al., 2010). Au jour E11.5, les CSH convergent vers le foie fœtal où il y aura prolifération, différenciation et production d'érythrocytes matures et des autres cellules fonctionnelles du sang. L'hématopoïèse définitive va finalement s'établir de façon permanente, pour le reste de la vie adulte, dans la moelle osseuse (Dzierzak and Speck 2008; Orkin and Zon 2008; Ottersbach et al., 2009; Swiers et al., 2010).

1.1.2 Cellules souches hématopoïétiques (CSH), progéniteurs et cellules matures

Les CSH adultes représentent une population très rare de cellules logées dans la moelle osseuse qui ne prolifèrent que sous des conditions précises hautement régulées. Contrairement aux CSH embryonnaires qui conservent une constante habileté d'auto-renouvellement, des études réalisées chez la souris ont démontré que les CSH adultes étaient majoritairement quiescentes. Fonctionnellement, les CSH adultes sont définies par leur capacité à reconstituer le système hématopoïétique d'un hôte ayant subi une irradiation totale, démontrant ainsi leur capacité de différenciation multilignée (multipotence) et leur potentiel d'auto-renouvellement (Mayani et al., 2009). Sur la base d'études de transplantation réalisées chez la souris, des cellules souches ayant un potentiel de repopulation post-transplantation à long terme (LT-CSH ; repopulation détectable à partir de la 2^{ième} semaine et persistant le long de la vie de la souris), intermédiaire (IT-CSH ; repopulation allant de la 2^{ième} semaine, déclinant à partir de la 8^{ième} semaine et s'épuisant totalement après un maximum de 20 semaines) et à court terme (ST-CSH ; repopulation allant jusqu'à 6 semaines) ont été décrites (Benveniste et al., 2010; Doulatov et al., 2012).

Par différenciation, les CSH donnent naissance aux progéniteurs multipotents (MPP) qui vont ensuite engendrer les progéniteurs communs dédiés à une seule lignée cellulaire, soit myéloïde (CMP) ou lymphoïde (CLP). Ces progéniteurs immatures ne sont pas

capables d'auto-renouvellement et auront un potentiel de différenciation de plus en plus limité au fur et à mesure de la progression vers des stades plus terminaux (Fig. 1.1).

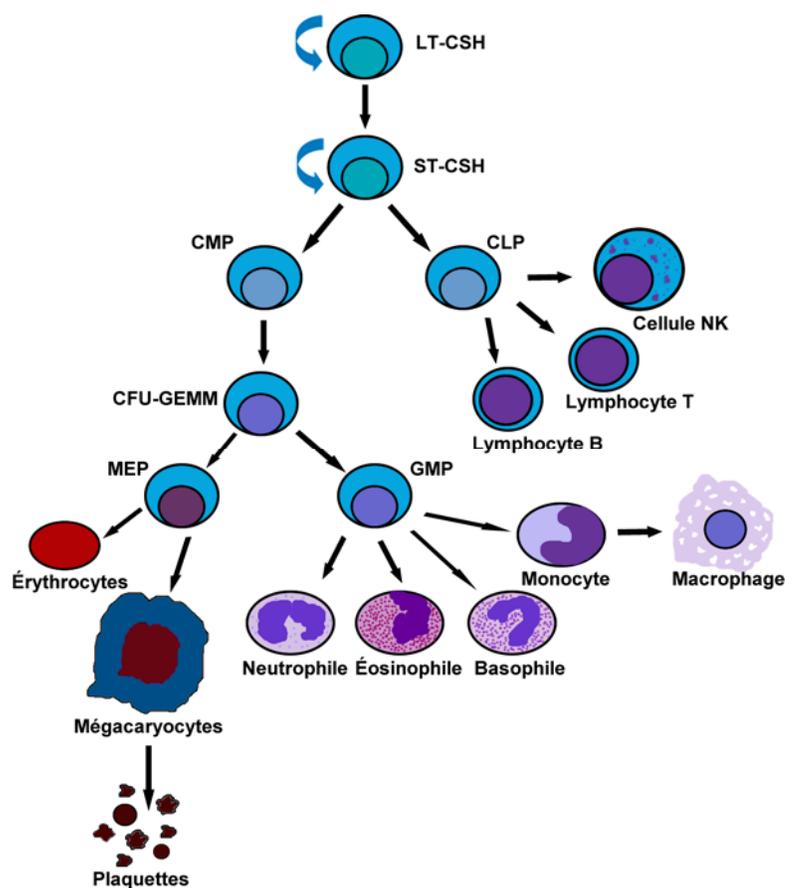


Figure 1.1. Hiérarchie du système hématopoïétique. Représentée au sommet de la pyramide de différenciation : la cellule souche hématopoïétique (CSH) à long terme (LT-CSH) et à court terme (ST-CSH). S'en suivent les progéniteurs myéloïdes communs (CMP), les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP), les différents progéniteurs engagés (CFU-GEMM « colony-forming unit-granulocytes, erythrocytes, monocytes and megakaryocytes » ; MEP, progéniteur mégacaryocytes-érythrocytes ; GMP, progéniteur granulocytes-monocytes) et les cellules plus matures constituant le système hématopoïétique. NK, « natural killer ».

La différenciation et la maturation des progéniteurs mènent ultimement à la production d'éléments matures capables de réaliser les fonctions essentielles du système hématopoïétique. Ces éléments matures incluent les plaquettes (thrombocytes), les globules rouges (érythrocytes), les globules blancs (leucocytes) dont les lymphocytes B, T et les cellules NK « natural killer », les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les monocytes et les macrophages (Fig. 1.1). Les plaquettes sont requises dans le processus d'hémostase tandis que les érythrocytes assurent le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans l'organisme. Les granulocytes défendent l'organisme contre les pathogènes et les lymphocytes maintiennent le système immunitaire. Chacune de ces cellules va apparaître, circuler et/ou se loger dans les différents compartiments formant le système hématopoïétique adulte (moelle osseuse, sang, rate, thymus et ganglions) afin de maintenir et de garantir le bon fonctionnement de l'organisme.

1.1.3 Le microenvironnement ou niche des CSH

La balance entre la prolifération ou la quiescence et l'auto-renouvellement ou la différenciation des CSH relève et dépend du microenvironnement de ces cellules. La niche représente une localisation anatomique définie où les CSH résident et intègrent diverses stimulations intrinsèques ou extrinsèques afin d'influencer leur comportement (Ferraro et al., 2010). La moelle osseuse est une niche spécialisée constituée d'une matrice extracellulaire, de cellules stromales, de vaisseaux sanguins et d'influx nerveux.

Dans la moelle osseuse, les CSH réalisent une vaste gamme d'interactions avec différents types cellulaires dont, entre autres, les ostéoblastes, les chondrocytes et les cellules endothéliales ainsi qu'avec des molécules sécrétées par les divers constituants de la niche (ex : facteurs de croissance, calcium, etc.). Les interactions avec ces cellules variées ou avec la matrice ainsi que l'intégration par la CSH de signaux extracellulaires lui permettent de réguler ses fonctions. Les voies de signalisation Wnt/ β -catenin (CTNNB1), « bone morphogenetic protein » (BMP), NOTCH/Delta et plusieurs facteurs de croissance dont le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF) sont d'importants modulateurs de la fonction et du maintien des CSH (Orkin and Zon 2008; Ferraro et al., 2010).

1.1.4 Régulation de l'hématopoïèse

Le maintien du système hématopoïétique est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme et implique un large spectre de protéines. De façon intéressante, plusieurs acteurs réalisant des fonctions essentielles dans l'hématopoïèse normale ont d'abord été identifiés par leur implication dans différentes translocations chromosomiques et autres anomalies génétiques dans les cancers hématologiques. Représentant majoritairement des facteurs ou co-facteurs de la transcription, ces acteurs regroupent notamment RUNX1 (anciennement nommé AML1 ou PEBP2 α B), TAL1 (anciennement nommé SCL), LMO2, MLL et ETV6 (anciennement nommé TEL) (Orkin and Zon 2008).

La régulation de l'hématopoïèse par cet important groupe de facteurs de transcription est complexe et notre compréhension de ces mécanismes est incomplète. Certains de ces facteurs sont nécessaires à la formation du système hématopoïétique et à l'émergence des CSH lors de l'embryogenèse. Ils peuvent également avoir une toute autre fonction dans l'hématopoïèse adulte, et ce, dépendamment du contexte cellulaire. Par exemple, RUNX1 est un facteur de transcription essentiel à la génération des CSH dans la région AGM chez l'embryon (Chen et al., 2009) alors qu'il affecte plutôt la différenciation et la maturation des lignées hématopoïétiques chez l'adulte (Ichikawa et al., 2004). De plus, selon le type cellulaire dans lequel il s'exprime, RUNX1 peut réguler de façon opposée, l'expression de certains gènes à un même stade de développement. Par exemple, l'expression du gène *SPII/PU.1* est normalement réprimée par RUNX1 dans les progéniteurs mégacaryocytes-érythrocytes (MEP) et un bas niveau d'expression est maintenu jusqu'aux cellules matures afin de favoriser la biogenèse des plaquettes (Huang et al., 2008). À l'opposé, l'expression de *SPII* est activée par RUNX1 dans les CMP et dans les progéniteurs granulocytes-macrophages (GMP) afin de favoriser la différenciation granulocytaire, ce qui démontre la diversité et la complexité de ce réseau de régulation (Huang et al., 2008).

D'autres facteurs tels que SPI1, CEBPA, GFI1 et GATA1 jouent aussi un rôle au niveau des cellules plus engagées et sont requis pour la différenciation des lignées spécifiques. L'expression plus restreinte de ces facteurs, selon un dosage précis, assure l'expression adéquate des gènes nécessaires au développement des lignées hématopoïétiques et

favorise la différenciation, tel que démontré par la régulation de l'expression de *SP11* par RUNX1. Par exemple, l'interaction entre les facteurs CEBPA (lignée granulocytaire : CEBPA⁺/GATA1⁻) et GATA1 (lignée mégacaryocytaire/érythroïde : CEBPA⁻/GATA1⁺) permet de contrôler la différenciation granulocytaire ou érythroïde et c'est la concentration relative de chacun des facteurs qui dictera le choix de la lignée (Koschmieder et al., 2009). Les interactions entre ces différents facteurs de transcription sont multiples et encore peu comprises (Orkin and Zon 2008; Wilson et al., 2010). Cependant, il est maintenant bien démontré que la dérégulation de l'expression et/ou la présence d'anomalies génétiques ciblant ces importants régulateurs peuvent perturber la différenciation normale des cellules hématopoïétiques et favoriser l'apparition de néoplasies du système hématopoïétique.

1.2. La leucémie : un cancer des cellules du sang

Le mot « leucémie » désigne un groupe hétérogène de cancers affectant plus spécifiquement les leucocytes du sang et de la moelle osseuse. Dans cette maladie, les cellules subissent un arrêt du processus de différenciation menant à une accumulation de cellules immatures anormales nommées blastes. Ces cellules blastiques prolifèrent rapidement de façon non contrôlée, envahissent progressivement la moelle et le sang et infiltrent graduellement d'autres organes incluant la rate, le foie et les ganglions. L'arrêt de maturation et la prolifération massive de blastes aboutissent à une production insuffisante des éléments matures du sang (leucocytes, érythrocytes et thrombocytes),

causant l'apparition de signes cliniques évocateurs dont la susceptibilité accrue aux infections (neutropénie), la fatigue (anémie) et des saignements (thrombocytopenie). La leucémie se présente sous différents aspects, selon le type cellulaire (lignée myéloïde ou lymphoïde) et l'évolution (leucémie aiguë ou chronique) de la maladie.

1.2.1 Incidence et pronostic

Selon les statistiques 2011 de la Société canadienne du cancer (www.cancer.ca), la leucémie représente le huitième cancer le plus diagnostiqué et la sixième cause de décès par cancer chez l'homme. Chez la femme, cette maladie occupe le dixième et le septième rang en terme d'incidence et de mortalité respectivement. On estime à plus de 5000 le nombre de nouveaux cas de leucémies diagnostiqués en 2011 chez l'adulte et à 2500 le nombre de décès reliés à cette maladie au Canada. Chez le jeune adulte (15-29 ans ; statistiques de 2009), la leucémie se classe parmi les cancers les plus courants (lymphomes, cancers de la thyroïde, tumeurs des cellules germinales et leucémies) et représente la première cause de décès par cancer, tout sexe confondu. Chez le jeune enfant (0-14 ans ; statistiques de 2008), la leucémie est le cancer le plus répandu et se classe au second rang en terme de décès par cancer.

L'incidence, le type de leucémie et le pronostic de la maladie sont particulièrement influencés par l'âge. En effet, la leucémie aiguë lymphoïde de la lignée B (LAL-B) est le type prédominant de leucémie chez l'enfant (~85 % de LAL versus 15 % de leucémie

aiguë myéloïde (LAM)) et est associée à une excellente survie à long terme de 87 % (Moorman et al., 2010). En contrepartie, la LAM représente le principal type de leucémie aiguë chez l'adulte (80 % de LAM versus 20 % de LAL) et un taux de survie inférieur à 40 % est décrit pour cette hémopathie (Deschler and Lubbert 2006).

1.2.2 Facteurs de risque des cancers hématologiques

Plusieurs facteurs de risques exogènes (environnementaux, expositions occupationnelles, infectieux) ou endogènes (composante génétique) sont associés à un risque accru de développer des cancers hématologiques dont la leucémie. Parmi les facteurs prédisposants, on note un âge avancé (> 60 ans), une histoire de néoplasie hématologique, certains syndromes génétiques, l'exposition à certains virus, bactéries ou produits chimiques et des antécédents de traitements de radiothérapie ou de chimiothérapie (Deschler and Lubbert 2006; Belson et al., 2007). Par exemple, l'administration de chimiothérapie adjuvante dans les cancers du sein s'associe à un risque jusqu'à cinq fois plus élevé de développer un syndrome myélodysplasique (SMD) ou une LAM secondaire à une chimiothérapie antérieure (t-SMD/LAM). Cependant, ce risque demeure globalement faible et le bénéfice du traitement surpasse les risques (Azim et al., 2011). Notons aussi que l'exposition chronique à des carcinogènes tel que le benzène prédispose à l'apparition de leucémie (risque ~1,4 fois supérieur (Khalade et al., 2010)). Un risque fortement augmenté de leucémies aiguës et de cancers hématologiques est aussi spécifiquement rapporté chez les patients atteints d'anémie de

Fanconi (~30-40 % des cas développeront une hémopathie maligne avant l'âge de 40 ans (Mace et al., 2007; Quentin et al., 2011)), de syndrome de Down (risque de 10 à 20 fois plus élevé de leucémies dans cette population) ou d'ataxie télangiectasie (35 % de cancers avant l'âge de 20 ans dont 50 % sont des lymphomes et 30 % des leucémies lymphoïdes (Bott et al., 2006)). Enfin, une prédisposition aux leucémies est également décrite dans les familles porteuses de mutations germinales des gènes *RUNX1*, *CEBPA* et plus récemment de *GATA2* (Smith et al., 2004; Owen 2010; Hahn et al., 2011). D'autres facteurs de risques sont plus faiblement corrélés au développement de leucémies dont l'exposition maternelle aux insecticides lors de la grossesse (Van Maele-Fabry et al., 2010) et l'exposition à des inhibiteurs environnementaux de l'ADN topoisomérase II (TOP2) dont les bioflavonoïdes (Strick et al., 2000; Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al., 2007).

1.3 Classification et génétique des leucémies aiguës

La classification des leucémies aiguës a débuté avec l'introduction de la classification French-American-British (FAB) en 1976 laquelle se basait sur des critères morphologiques et immunophénotypiques uniquement (Bennett et al., 1976; Lee et al., 1987). Cette classification reconnaît sept types morphologiques de LAM [avec différenciation minimale (M0), sans maturation (M1), avec maturation (M2), promyélocytaire (M3), myélomonocytaire (M4), monoblastique/monocytaire (M5), érythrocytaire (M6) et mégacaryocytaire (M7)] et trois types de LAL [petites cellules

uniformes (L1), larges cellules hétérogènes (L2) et larges cellules uniformes avec vacuoles (L3)]. Depuis, plusieurs anomalies génétiques ont été découvertes puis associées à des morphologies plus particulières, permettant l'émergence de nouveaux groupes de leucémies aiguës. Citons, par exemple, l'association entre l'inversion du chromosome 16 [inv(16)(p13q22)] et la présence d'une leucémie myélomonocytaire avec éosinophiles anormaux dans la moelle osseuse (LAM M4Eo). Ainsi, une classification des leucémies aiguës basée sur des critères morphologiques, immunophénotypiques, cliniques et génétiques a été proposée par le « World Health Organization » (WHO) et est maintenant la référence en matière de classification des cancers hématologiques (Swerdlow et al., 2008).

1.3.1 Génétique des LAM *de novo*

Plusieurs anomalies génétiques sont reconnues comme des facteurs pronostiques indépendants dans les LAM. Ces anomalies se classent selon trois groupes pronostiques : favorable, intermédiaire et défavorable. La table 1.1 rapporte les données de survie globale à 10 ans pour les individus âgés de moins de 60 ans atteints de LAM (Grimwade et al., 2010). Outre la génétique qui demeure un facteur prédictif de survie indépendant, l'âge (> 60 ans : défavorable), le décompte des leucocytes et une histoire de néoplasie hématologique antérieure (LAM secondaire : défavorable) sont aussi importants.

Pronostic	Anomalie génétique	Gène de fusion	Fréquence	Survie globale à 10 ans
Favorable	t(15;17)(q24;q21)	<i>PML-RARA</i>	13%	81 %
	t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	7%	61 %
	inv(16)(p13.1q22)/ t(16;16)(p13.1;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	5%	55 %
Intermédiaire	t(9;11)(p22;q23)	<i>MLL-MLLT3/AF9</i>	1%	39 %
	caryotype normal	-	41%	38 %
Défavorable	t(11q23) (excluant t(9;11))	<i>MLL-gènes partenaires</i>	~4%	22% (variable selon l'anomalie)
	t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK-NUP214/CAN</i>	1%	27 %
	inv(3)(q21q26.2)	<i>RPNI-EVII</i>	1%	3 %

Table 1.1 Fréquence et survie globale à 10 ans des principales anomalies génétiques des leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte âgé entre 16 et 59 ans. Données tirées de Grimwade et coll., Blood. 2010 Jul 22;116(3):354-65.

1.3.2. Génétique des néoplasies myéloïdes secondaires à la chimiothérapie

Les LAM secondaires à une chimiothérapie antérieure ou « therapy-related » (t-LAM) comptent pour 10 à 20 % des LAM et sont des maladies de mauvais pronostic associées à une survie moyenne de moins de 10 % à 5 ans (Swerdlow et al., 2008). Traditionnellement, ces t-LAM étaient divisées en leucémies secondaires à un traitement par des inhibiteurs de la TOP2 (par exemple : épipodophyllotoxines et anthracyclines) ou en leucémies secondaires à un traitement par des agents alkylants (par exemple : melphalan, cyclophosphamide, cisplatine et busulfan). Dû à l'utilisation combinée de plusieurs chimiothérapies dans le traitement actuel des leucémies et autres cancers, cette classification se base maintenant davantage sur l'anomalie génétique plutôt que sur le traitement reçu (Swerdlow et al., 2008).

Les leucémies secondaires aux inhibiteurs de la TOP2, représentant 20-30 % des t-LAM, sont associées à une courte latence et se développent à l'intérieur d'une période de 1 à 5 ans, sans histoire de syndrome myélodysplasique. Ce type de maladie est principalement caractérisé par la présence de translocations chromosomiques impliquant les gènes *MLL* (11q23) et *RUNXI*, quoique des réarrangements de *CBFB* (16q22), *RARA* (17q21) et *NUP98* (11p15) sont aussi décrits. Globalement, les leucémies secondaires avec réarrangements de *RUNXI* ont une survie globale à 5 ans de 18 % et une survie médiane d'environ 14 mois (Slovak et al., 2002). À l'intérieur de ce groupe d'anomalies de *RUNXI*, une survie médiane hétérogène est observée selon le partenaire de translocation, allant de 17 mois pour les t(8;21)(q22;q22) à moins de 5 mois pour les réarrangements de *RUNXI* avec des partenaires plus rares (Slovak et al., 2002). Étant beaucoup plus fréquentes (80-85 % des t-LAM), les leucémies secondaires aux agents alkylants apparaissent à l'intérieur d'une période de 5 à 10 ans post-traitement et sont associées à un pronostic très défavorable. Ces leucémies sont souvent précédées d'un syndrome myélodysplasique et sont associées à des anomalies non balancées des chromosomes 5 et/ou 7 et à des caryotypes complexes (Qian et al., 2010).

1.3.3 Génétique des LAL *de novo* de la lignée B

De façon similaire aux LAM, les anomalies génétiques sont de précieux indices appuyant le diagnostic et sont d'importants facteurs prédictifs de survie dans les LAL-B. Les anomalies génétiques retrouvées chez l'enfant et chez l'adulte sont partagées, mais

représentées à des fréquences variables (Tables 1.2-1.3). Une stratification pronostique en trois groupes est décrite chez l'enfant (pronostic favorable, intermédiaire et défavorable). Toutefois, aucune anomalie ne possède de réel pronostic favorable dans les LAL-B de l'adulte. En effet, le taux de survie globale est faible dans cette maladie chez l'adulte (37 % à 10 ans) et les données spécifiques à certains groupes génétiques sont encore limitées, vu la plus faible incidence des LAL (75 % de LAL-B et 25 % de LAL-T) par rapport aux LAM dans cette population. En plus de la génétique, l'âge (< 1 an et > 10 ans pour les LAL-B : pronostic défavorable), le décompte des leucocytes ($> 30 \times 10^9/L$ pour les LAL-B : pronostic défavorable) et l'immunophénotype (le type T étant plutôt de pronostic intermédiaire avec une survie globale à 5 ans de 48 %) (Marks et al., 2009) représentent des facteurs prédictifs importants qui ont un impact sur la survie des patients atteints de LAL.

Pronostic	Anomalie génétique	Gène de fusion	Fréquence	Survie globale à 5 ans
Favorable	t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6/TEL-RUNX1</i>	25%	96%
	Hyperdiploïdie élevée (51-65 chromosomes)	-	38%	93%
Intermédiaire	t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3/E2A-PBX1</i>	4%	84%
Défavorable	Amplification de <i>RUNX1</i>	-	2%	69%
	Réarrangements de <i>MLL</i>	<i>MLL-gènes partenaires</i>	2%	60%
	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	3%	58%
	Hypodiploïdie (30-39 chromosomes)	-	1%	50%
	Near-haploïdie (< 30 chromosomes)	-	1%	40%

Table 1.2. Fréquence et survie globale à 5 ans des principales anomalies génétiques des leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée B de l'enfant âgé entre 1 et 18 ans. Données tirées de Moorman et coll., Lancet Oncol. 2010 May;11(5):429-38.

Pronostic	Anomalie génétique	Gène de fusion	Fréquence	Survie globale à 5 ans	Nb patients
Intermédiaire	t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6/TEL-RUNX1</i>	2%*	57%*	10 Ph-*
	Hyperdiploïdie élevée (51-65 chromosomes)	-	10%	53%	77 Ph-
	t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3/E2A-PBX1</i>	3%, 5%*	32% et 51%*	24 Ph-, 23 Ph-*
	Délétion partielle 9p21	-	9%	58%	71 Ph-
Défavorable	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	19%	22%	267 Ph+
	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AFF1/AF4</i>	7%	24%	54 Ph-
	t(8;14)(q24;q32)	<i>IGH-MYC</i>	2%	13%	16 Ph-
	Caryotype complexe (5 anomalies ou plus)	-	5%	28%	41 Ph-
	Hypodiploïdie/near- triploïdie (Ho-Tr)	-	4%	22%	31 Ph-

Table 1.3. Fréquence et survie globale à 5 ou 10 ans des principales anomalies génétiques des leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée B de l'adulte âgé entre 15 et 65 ans. Le nombre de patients dans chaque groupe génétique (Nb patients) avec (Ph+) ou sans (Ph-) chromosome Philadelphie est indiqué. Les survies globales relatives à une période de 5 ans ont été tirées de Moorman et coll., Blood. 2007 Apr 15;109(8):3189-97. Les survies globales relatives à une période de 10 ans ainsi que le nombre de patients avec fusion *ETV6-RUNX1* ou *TCF3-PBX1* (marqués par *) ont été tirées de Burmeister et coll., Haematologica. 2010 Feb;95(2):241-6.

1.3.4 Génétique des leucémies aiguës à phénotype mixte « MPAL »

La leucémie aiguë à phénotype mixte (MPAL) est une entité pouvant exprimer des antigènes d'au moins deux lignées différentes sur une même cellule blastique, sur des populations blastiques distinctes ou une combinaison des deux. La fusion des gènes *BCR* et *ABL1*, résultant de la t(9;22)(q34;q11.2), est détectée dans 30 % des MPAL (Weinberg and Arber 2010). La MPAL avec fusion *BCR-ABL1* est une entité rare de très mauvais pronostic qui représente moins de 1 % de l'ensemble des leucémies aiguës (Xu et al., 2009). La t(9;22)(q34;q11.2) génère des protéines chimériques BCR-ABL1,

lesquelles acquièrent une activité tyrosine kinase constitutive permettant l'activation de plusieurs voies de signalisation affectant la prolifération, la survie, l'adhésion cellulaire et la migration (Quintas-Cardama and Cortes 2009). Des réarrangements du gène *MLL* menant à la création des fusions *MLL-AFF1/AF4*, *MLL-MLLT3/AF9* et *MLL-ENL* sont aussi décrits dans ce type de leucémie.

1.4. L'hématopoïèse leucémique : l'importance de la cellule souche leucémique

Notre compréhension du processus de leucémogénèse s'est grandement améliorée grâce à la découverte des différentes anomalies chromosomiques à partir des années 1960. Il est maintenant accepté que la LAM est un désordre complexe d'ordre génétique. Plus d'une centaine de gènes de fusion (produit anormal engendré lors d'une fusion de deux séquences codantes provenant de gènes différents) ciblant plus fréquemment les gènes *MLL*, *ETV6*, *NUP98* et *RUNX1* ont spécifiquement été décrits dans les LAM (Mitelman et al., 2007) et de nouvelles anomalies génétiques sont continuellement rapportées (mutations, translocations, délétions, etc.). Ces anomalies chromosomiques sont généralement décrites comme des événements primaires transformants capables d'initier le développement hématopoïétique anormal. Pour qu'une cellule leucémique persiste, celle-ci doit être en mesure d'acquérir un avantage prolifératif en outrepassant les différents contrôles régulant l'hématopoïèse normale.

Il a été proposé que cet avantage prolifératif, se traduisant par une prolifération non contrôlée et un arrêt de maturation des cellules blastiques, puisse être relié à l'auto-renouvellement. En effet, plusieurs évidences supportent que la LAM soit une maladie des cellules souches hématopoïétiques initiée par une cellule souche leucémique (CSL) dite « leukemia-initiating cell » (LIC) (Lapidot et al., 1994; Bonnet and Dick 1997). Située au sommet de la hiérarchie, la LIC serait la contrepartie anormale de la CSH et posséderait une capacité d'auto-renouvellement à long terme lui permettant d'initier et de soutenir le phénotype leucémique (Fig. 1.2) (Mayani et al., 2009). Une étude réalisée par Bonnet et Dick a suggéré, pour la première fois, l'existence des LIC dans les LAM. En effet, ces auteurs ont démontré qu'une population de cellules immatures $CD34^+/CD38^-$ isolées de tous les types morphologiques de LAM humaine, à l'exception de la leucémie promyélocytaire aiguë (LPA), pouvait reproduire une leucémie dans un modèle murin NOD/SCID « nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency » (Bonnet and Dick 1997; Wojiski et al., 2009), suggérant ainsi l'existence des LIC. Malgré cette démonstration, la nature de la CSL/LIC de la LAM demeure encore imprécise. Cette origine cellulaire s'appuie également sur plusieurs études qui ont démontré que différents types cellulaires (CSH ou progéniteurs) étaient capables d'initier et de soutenir un phénotype leucémique dans une souris receveuse. En fait, l'étude des gènes de fusion *MLL-MLLT3/AF9* (Krivtsov et al., 2006), *MLL-ENL* (Cozzio et al., 2003) et *MOZ-TIF* (Huntly et al., 2004), exprimés au sein de progéniteurs GMP par une méthode d'infection rétrovirale, a démontré que ces chimères étaient capables de rétablir le phénotype d'une cellule souche dans ces progéniteurs initialement dépourvus

de cette caractéristique. Or, une récente publication étudiant la fusion *MLL-MLLT3/AF9* à partir de son propre promoteur dans un modèle murin de type « knock-in » a suggéré que seules les CSH et les CMP *MLL-MLLT3*⁺ étaient capables d'induire une leucémie dans des souris irradiées alors que les GMP ne possédaient pas cette capacité (CSH>CMP>GMP) (Chen et al., 2008). Malgré les conclusions contradictoires de ces études quant à l'origine de la CSL/LIC, son existence dans la LAM est cependant bien acceptée.

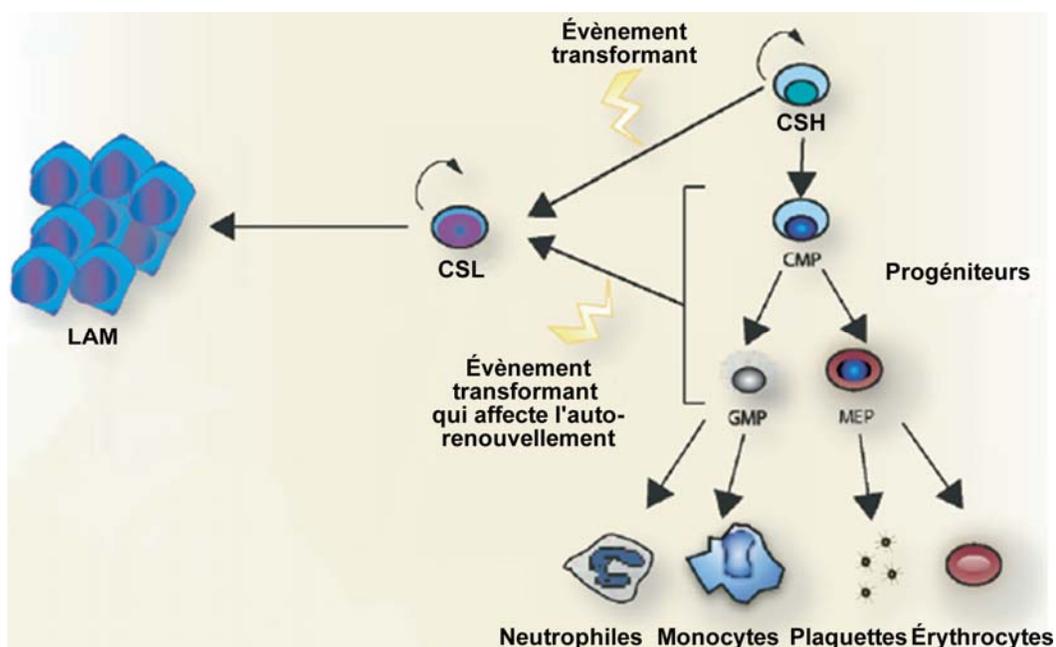


Figure 1.2. Évènements transformants possibles menant au développement de la leucémie aiguë myéloïde (LAM). Une cellule souche leucémique (CSL) peut être générée par la transformation d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) possédant déjà une capacité d'auto-renouvellement ou peut survenir par la transformation d'un progéniteur si l'évènement transformant procure à cette cellule la capacité d'auto-renouvellement. CMP, progéniteur commun myéloïde ; GMP, progéniteur granulocyte-

macrophage ; MEP, progéniteur mégacaryocytaire-érythroïde. Figure reproduite et adaptée de Semin Oncol, 35(4), Chan and Huntly, « Leukemia Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia », 326-35, copyright 2008, avec la permission de Elsevier.

1.5. RUNX1 « Runt-related transcription factor 1 »

1.5.1 RUNX1, un maître régulateur de l'hématopoïèse

La revue des principales anomalies cytogénétiques des leucémies aiguës démontre la récurrence des anomalies ciblant le complexe hétérodimérique « core binding factor » (CBF) [sous-unité alpha : *RUNX1* ; sous-unité bêta : *CBFB*] et révèle, plus particulièrement, l'importance de *RUNX1* dans la pathogenèse des leucémies aiguës, tel que traduit par la fréquence de ses réarrangements. Localisé à la bande chromosomique 21q22.12, le gène *RUNX1* couvre une région génomique de 260 kb et est composé de 10 exons codants (Mikhail et al., 2006). *RUNX1* appartient à la grande famille des facteurs de transcription et partage, avec les deux autres membres de la famille *RUNX* (*RUNX2* et *RUNX3*), un domaine RHD « Runt homology domain » hautement conservé de 128 acides aminés qui fut initialement découvert chez la *Drosophila melanogaster*. Malgré une importante similarité de structure entre ces trois protéines, celles-ci possèdent des fonctions biologiques divergentes. *RUNX1* est décrit tel un maître régulateur du développement hématopoïétique. *RUNX2* joue un rôle dans la maturation des ostéoblastes et dans l'ostéogénèse alors que *RUNX3* est impliqué dans la thymopoïèse, dans la maturation des lymphocytes T et dans la neurogenèse (Ito 2004).

Le gène *RUNX1* possède deux promoteurs distincts (P1 distal et P2 proximal) permettant l'expression, à divers stades du développement, de plusieurs transcrits de taille et de composition différentes (Levanon D 2001; Levanon and Groner 2004). Les trois principaux transcrits de *RUNX1*, nommés *RUNX1a*, *RUNX1b* et *RUNX1c*, diffèrent selon leurs régions 5' et 3'UTR « untranslated region » et codent respectivement pour des protéines de 250, 453 et 480 acides aminés (Fig. 1.3).

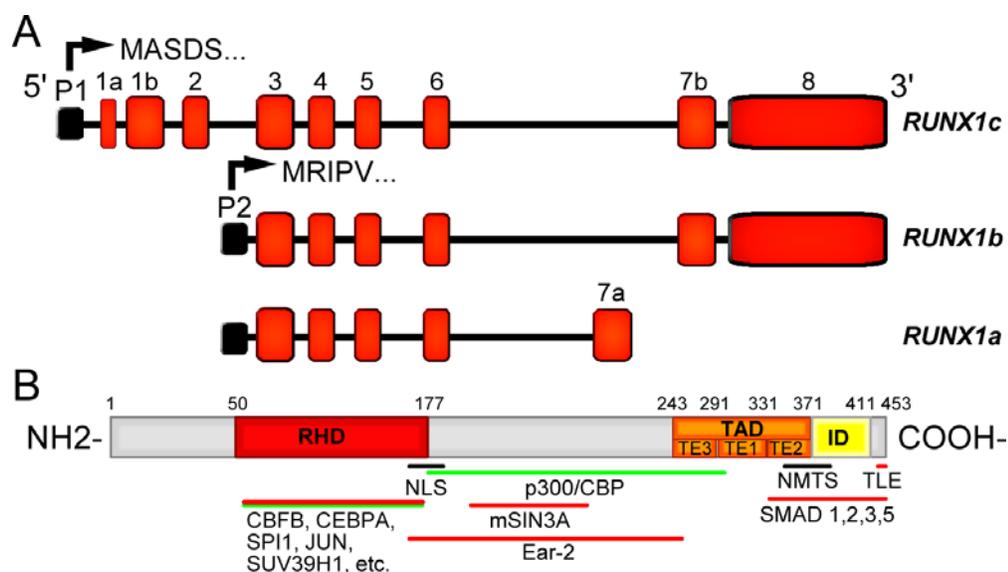


Figure 1.3. Représentation schématique des transcrits de *RUNX1* et de sa protéine.

(A) Les trois transcrits (a, b et c) de *RUNX1* sont représentés. Les boîtes oranges représentent les exons codants de *RUNX1*. P1, promoteur P1 distal ; P2, promoteur P2 proximal ; MASDS, acides aminés traduits à partir du promoteur P1 ; MRIPV, acides aminés traduits à partir du promoteur P2 proximal. (B) Schéma de la protéine RUNX1b et de ses partenaires d'interaction. Le domaine RHD « Runt homology domain » (acides aminés 50 à 177) et le domaine de régulation transcriptionnelle, formé du domaine

d'activation transcriptionnelle (TAD ; TE1à TE3) et du domaine de répression transcriptionnelle (ID), sont schématisés. Les divers sites d'interaction avec les co-activateurs (lignes vertes) et co-répresseurs (lignes rouges) de la transcription sont représentés. Les signaux NLS (signal de localisation nucléaire) et NMTS (signal de localisation à la matrice nucléaire ; acides aminés 351-381) sont indiqués par des lignes noires.

Les transcrits *RUNX1a*, *RUNX1b* et *RUNX1c* expriment tous conjointement les exons 3 à 5 lesquels codent pour le domaine RHD. Localisé à la partie N-terminale de la protéine, le RHD confère un pouvoir de liaison à l'ADN au niveau des séquences consensus TGT/cGGT retrouvées dans les éléments régulateurs d'une multitude de gènes et permet l'hétérodimérisation avec la protéine CBFβ. L'hétérodimérisation permet une modification de la conformation du RHD ce qui confère à ce domaine une plus forte affinité de liaison à l'ADN. L'hétérodimérisation stabilise et protège aussi RUNX1 contre une dégradation par le protéasome (Huang et al., 2001; Asou 2003). Un signal de localisation nucléaire (NLS), retrouvé à la suite du domaine RHD, ainsi qu'un signal de localisation à la matrice nucléaire (NMTS), identifié dans la partie C-terminale de la protéine (acides aminés 351 à 381), permettent à RUNX1 sauvage de s'associer à la matrice nucléaire et de s'exprimer sous forme de signal ponctué au sein des foci d'activation transcriptionnelle (Zeng et al., 1997; Zeng et al., 1998). Le domaine de régulation transcriptionnelle (TAD/ID) est composé de trois régions d'activation transcriptionnelle, TE3 (acides aminés 243-291), TE1 (acides aminés 291-331) et TE2 (acides aminés 331-371), lesquelles sont codées par les exons 7b et 8 de *RUNX1* alors

qu'une région d'inhibition transcriptionnelle s'exprime à la toute fin de la protéine (acides aminés 371-411) (Fig. 1.3B) (Ito 1999; Ito 2004). Les domaines RHD et TAD/ID sont tous deux exprimés par les isoformes résultant des transcrits *RUNX1b* et *RUNX1c*, lesquels diffèrent par la présence de 27 acides aminés codés par les exons 1 et 2 du transcrit *RUNX1c*. Dû à l'utilisation alternative de l'exon 7a, le transcrit *RUNX1a* code pour une plus petite protéine ne conservant que le RHD. *RUNX1b* est la forme prédominante exprimée et représente, si non autrement spécifié, le transcrit de référence.

RUNX1 est un régulateur transcriptionnel qui active ou réprime la transcription de plusieurs gènes cibles, selon le contexte cellulaire et le stade de développement. Seul, RUNX1 n'a qu'un faible pouvoir régulateur. Une coopération avec plusieurs protéines est requise afin de réaliser son plein potentiel activateur/répresseur. Ainsi, des séquences consensus d'autres facteurs de transcription incluant les facteurs CEBPA, MYB, SPI1 et GATA1 sont souvent retrouvées près des éléments de liaison de RUNX1 afin d'agir en synergie et de collaborer à la régulation des cibles de ce facteur de transcription (Mikhail et al., 2006). En plus de ces interactions en *cis*, d'autres co-régulateurs peuvent agir par association directe à RUNX1 (en *trans*) afin de moduler et d'influencer son potentiel régulateur. Par exemple, le recrutement par RUNX1 de co-activateurs tels que p300/CBP, P/CAF et MOZ engendre l'ouverture de la chromatine par acétylation des histones et favorise la transcription de ces cibles (Fig. 1.4) (Kitabayashi et al., 1998). Les gènes codant pour l'interleukine-3 (IL3), le GM-CSF, le récepteur du M-CSF (CSF1R), la myéloperoxidase (MPO), la neutrophile élastase (NE), la granzyme B, les sous-unités

du récepteur des cellules T, l'IL2, SPI1, MYB, FLT3 et P14ARF sont quelques-unes des cibles directes d'activation transcriptionnelle dépendantes de RUNX1 (Fig. 1.4).

Malgré qu'il soit surtout connu comme un activateur de la transcription, RUNX1 peut aussi recruter des co-répresseurs dont mSIN3A, Ear-2 et TLE et réprimer l'expression de certains gènes cibles. Par exemple, mSIN3A peut lier la portion centrale de la protéine et permettre le recrutement d'autres répresseurs tels que les histones déacétylases (HDACs), ce qui renforce l'activité répressive de RUNX1. Le domaine RHD peut aussi lier l'histone lysine méthyltransférase SUV39H1 ce qui entraîne une diminution de l'affinité de liaison de RUNX1 à l'ADN et une diminution de la transcription de ses cibles par méthylation (Soumen Chakraborty 2003). Les gènes *CDKN1A* (*P21/WAF1/CIP1*) et *SPI1* (spécifiquement dans les MEP) sont des exemples de cibles de répression transcriptionnelle directe de RUNX1 (Fig. 1.4) (Huang et al., 2008).

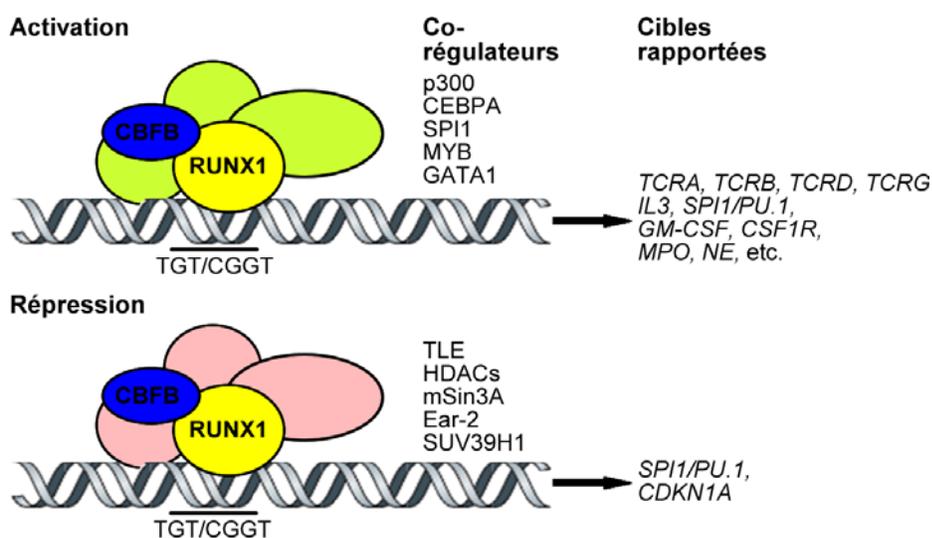


Figure 1.4. Environnement transcriptionnel de RUNX1. Modulation de l'activité transcriptionnelle de RUNX1 via des interactions tissus-spécifiques entre des co-activateurs et des co-répresseurs de la transcription, lesquels ouvrent ou condensent respectivement la chromatine au niveau des gènes cibles de RUNX1. Une liste non exhaustive des cibles d'activation ou de répression identifiées à ce jour est représentée.

Ces interactions sont également régies par une variété de modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation et la méthylation et ces modifications permettent la stabilisation ainsi que la modulation du pouvoir transcriptionnel de la protéine RUNX1 (Huang et al., 2001; Imai et al., 2004; Zhao et al., 2008). Cette modulation de la balance entre l'activation et la répression transcriptionnelle dépendante de RUNX1 est aussi influencée par l'expression des différentes isoformes qui, par leur composition variable, suggèrent des fonctions différentes et/ou complémentaires. En fait, il a été démontré que les isoformes RUNX1b et RUNX1c agissent de façon similaire, tel des activateurs transcriptionnels. Cependant, la courte forme RUNX1a, laquelle n'exprime pas le domaine TAD/ID, semble posséder une plus grande affinité de liaison à l'ADN et agir de façon dominante négative sur l'isoforme RUNX1b, réprimant plutôt la transcription (Tanaka et al., 1995; Mikhail et al., 2006). Toutefois, le très petit nombre d'études traitant de la fonction de ces isoformes ne nous permet pas de confirmer avec certitude ces fonctions proposées.

En résumé, l'ensemble de ces interactions décrites avec RUNX1 démontrent clairement que le complexe hétérodimérique CBF fonctionne tel un organisateur transcriptionnel

qui recrute des facteurs tissus-spécifiques à l'intérieur de larges complexes nucléaires afin de moduler, soit par activation ou par répression, la transcription de ses cibles. L'environnement protéique de cet important facteur de transcription influence donc fortement sa fonction de régulateur des différents programmes d'expression de l'hématopoïèse normale.

1.5.2 Étude des fonctions de *RUNX1* par les modèles murins

1.5.2.1. Contexte embryonnaire

Pour étudier les différentes fonctions de *RUNX1*, divers modèles murins ont été réalisés. Ces études ont permis de confirmer que les fonctions de *RUNX1* sont régies par le stade de développement (embryonnaire ou adulte) et par le type cellulaire dans lequel il s'exprime (Table 1.4).

Chez la souris, *Runx1* s'exprime très tôt lors du développement embryonnaire dans les sites d'initiation de l'hématopoïèse (sac vitellin, artères ombilicales et vitellines, région AGM et foie fœtal) laissant suggérer un rôle joué par ce facteur de transcription dans l'élaboration de l'hématopoïèse (North et al., 1999). En effet, il a été démontré que la délétion homozygote de *Runx1* (*Runx1*^{-/-}) résulte en une mort embryonnaire des souris au jour E12.5 des suites d'hémorragies massives au niveau du système nerveux central, de l'espace péricardique et de la cavité péritonéale (Okuda et al., 1996; Wang et al.,

1996a). L'absence de regroupement intra-artériel ou « intra-arterial cluster » de CSH dans la région AGM, l'absence de progéniteurs hématopoïétiques dans le sac vitellin et l'absence d'érythrocytes, de mégacaryocytes et d'éléments myéloïdes matures dans le foie fœtal de ces souris caractérisent ce modèle. L'absence de plaquettes circulantes et la présence d'une anémie résultant d'une inefficacité à produire des érythrocytes énucléés matures expliquent la mort des souris *Runx1*^{-/-}. Malgré un défaut d'émergence de l'hématopoïèse définitive dans ce modèle, une ébauche d'hématopoïèse primitive (érythrocytes primitifs) dérivée du sac vitellin est présente (Wang et al., 1996a). Un phénotype similaire a été décrit pour les souris avec une délétion homozygote du gène *Cbfb* (Sasaki et al., 1996; Wang et al., 1996b), ce qui a permis de confirmer l'importance du complexe CBF dans l'émergence et le développement de l'hématopoïèse définitive.

Le profil d'expression précoce de *Runx1* dans les premiers sites d'apparition des CSH laisse également entrevoir un rôle essentiel de ce gène dans l'émergence des CSH. Un modèle hétérozygote *Runx1*^{+/-} supporte qu'un dosage inadéquat de *Runx1* altère l'émergence, la migration et le maintien des CSH au stade embryonnaire. Un dosage incorrect de *Runx1* permet l'apparition précoce (un jour plus tôt) des CSH dans le sac vitellin et dans la région AGM (décalage temporel et spatial) puis engendre une extinction prématurée de l'activité de ces cellules dans la région AGM, menant à une diminution quantitative des CSH très tôt dans l'embryon *Runx1*^{+/-} (Cai et al., 2000). Par la suite, il a été démontré que *Runx1* est effectivement impliqué dans l'émergence des CSH à partir de l'endothélium hémogénique de la région AGM (Chen et al., 2009),

région où apparaissent les îlots de cellules sanguines ou « blood island » et les regroupements intra-artériels de cellules sanguines. En effet, c'est à l'intérieur des îlots sanguins/regroupements intra-artériels qu'apparaissent les progéniteurs des érythrocytes primitifs lesquels seront graduellement entourés des progéniteurs définitifs qui donneront naissance et maintiendront l'ensemble du système hématopoïétique définitif du fœtus et de l'adulte (Zovein et al., 2008; Chen et al., 2009). Suite à la délétion conditionnelle de *Runx1* (*Runx1^{fl/fl}*) dans un modèle murin, il n'y a pas formation de regroupements intra-artériels/îlots de cellules sanguines, ni formation de cellules hématopoïétiques à partir des cellules endothéliales confirmant que *Runx1* régule cette importante étape de transition guidant l'émergence des CSH (North et al., 1999; Yokomizo et al., 2001; Chen et al., 2009). Ainsi, un dosage inadéquat de *Runx1* peut contrevenir au développement des CSH et affecter le développement de l'hématopoïèse définitive dans l'embryon.

1.5.2.2 Contexte adulte

Chez la souris adulte, *Runx1* s'exprime dans l'ensemble des tissus, excluant le cœur et le cerveau, avec une forte expression dans le thymus, la moelle osseuse et le sang (Levanon and Groner 2004). *Runx1* s'exprime fortement dans les progéniteurs immatures et son expression diminue en fonction de la maturation des cellules myéloïdes et lymphoïdes T. Une plus forte expression est cependant observée dans les lymphocytes T CD4⁺ alors qu'un niveau constant est maintenu dans les lymphocytes B

tout au long de leur maturation. Une discrète expression de *Runx1* est aussi retrouvée dans les progéniteurs érythroïdes précoces et cette expression diminue rapidement avec la maturation des érythrocytes (Lorsbach et al., 2004).

De façon intéressante, un phénotype hétérozygote *RUNXI*^{+/-} est décrit chez l'homme, lequel est caractérisé par des mutations ou des délétions germinales de *RUNXI*. Ces mutations/délétions sont à la base du désordre plaquettaire familial (FPD) ; un syndrome autosomal dominant rare caractérisé par une thrombocytopénie, par une diminution de la formation de colonies mégacaryocytaires, par des anomalies de structure des plaquettes et par une prédisposition aux leucémies aiguës (20 à 50 % des patients affectés développeront un SMD/LAM) (Owen 2010). Un risque de progression leucémique est particulièrement rapporté chez les individus porteurs de mutations bialléliques de *RUNXI* (Preudhomme et al., 2009). L'association entre le développement de leucémie et l'altération de cet important régulateur est appuyée par la description de translocations chromosomiques et de mutations acquises dans des cas de leucémies aiguës, démontrant qu'un dosage inadéquat de *RUNXI* puisse aussi altérer le développement hématopoïétique normal chez l'adulte (Tang et al., 2009; Schnittger et al., 2011).

Tel qu'identifié chez les patients avec FPD, une légère réduction du nombre de plaquettes est aussi notée dans un modèle de souris adulte mimant l'haploinsuffisance de *RUNXI* (*Runx1*^{+/-}) (Sun and Downing 2004). Ce modèle est caractérisé par une diminution des lymphocytes T CD4⁺ et par une augmentation des progéniteurs

multilignées de même que des progéniteurs engagés. De plus, une réduction du nombre de LT-CSH est notée (Sun and Downing 2004).

Ce phénotype est accentué chez la souris adulte suite à une délétion conditionnelle homozygote de *Runx1* (*Runx1^{-/-}*) où une thrombocytopénie est observée due à un défaut de la maturation des mégacaryocytes. Ce modèle possède aussi un nombre augmenté de progéniteurs multilignées et de progéniteurs myéloïdes et mégacaryocytaires immatures et est caractérisé par une expansion du compartiment myéloïde (Ichikawa et al., 2008). On note également une augmentation de la population immature de thymocytes double-négatifs suivi d'une réduction des lymphocytes T CD4⁺ et d'un développement anormal des lymphocytes B, confirmant que la protéine Runx1 agisse tel un régulateur de la différenciation hématopoïétique chez l'adulte (Fig. 1.5) (Ichikawa et al., 2004; Gowney et al., 2005).

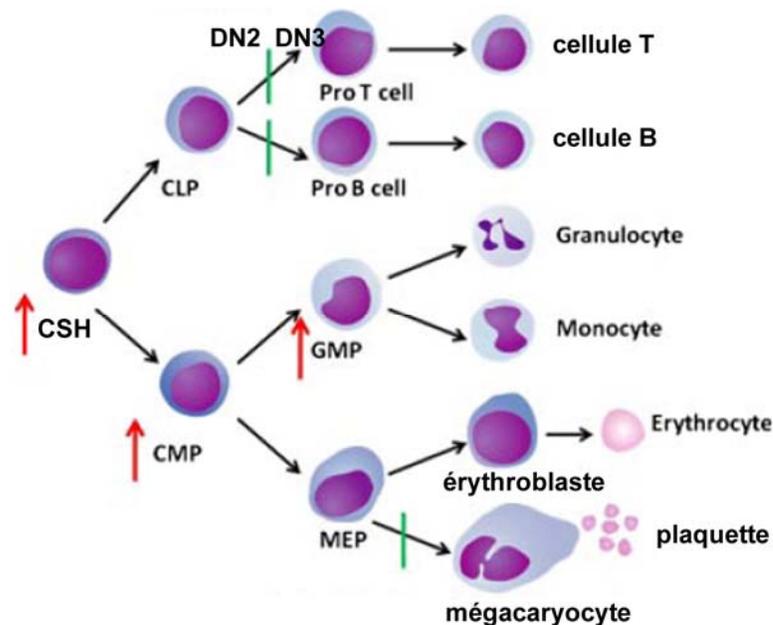


Figure 1.5. Effet d'une délétion homozygote de *Runx1* dans l'hématopoïèse adulte. Les flèches rouges montrent l'augmentation des populations de CSH (cellule souche hématopoïétique), de CMP (progéniteur commun myéloïde) et de GMP (progéniteur granulocyte-monocyte) alors que les lignes vertes indiquent la diminution des populations cellulaires matures B et T et des mégacaryocytes normaux. La perte de *Runx1* permet une accumulation des cellules T immatures due à une transition anormale entre les stades double négatif DN2 (lymphocyte T double-négatif stade 2) et double négatif DN3 (lymphocyte T double-négatif stade 3) et permet une accumulation de mégacaryocytes immatures causant ultimement une réduction des plaquettes. CLP, progéniteur commun lymphoïde ; MEP, progéniteur mégacaryocyte-érythroïde. Figure reproduite et adaptée avec permission de John Wiley and Sons, J Cell Physiol, 222(2), 282-5, « The role of Runx1/AML1 and Evi-1 in the regulation of hematopoietic stem cells », Kumano and Kurokawa, copyright 2010.

Modèle	Phénotype	Référence
<i>Runx1</i> ^{-/-}	Absence de plaquette	Okuda et al., 1996
embryon	Absence d'hématopoïèse définitive Absence de CSH et de progéniteurs dans la région AGM	Wang et al., 1996
<i>Runx1</i> ^{+/-}	Apparition précoce des CSH	Cai et al., 2000
embryon	↓ de la capacité de maintien et d'expansion des CSH dans la région AGM Réduction globale de la quantité de CSH	
<i>Runx1</i> ^{+/-}	↓ des LT-CSH	Sun and Downing, 2004
adulte	↑ des progéniteurs multilignées et des progéniteurs engagés ↓ des plaquettes et des lymphocytes T CD4 ⁺	
<i>Runx1</i> ^{-/-}	↓ des plaquettes et des lymphocytes T CD4 ⁺	Ichiwaka et al., 2004
adulte	↑ des progéniteurs immatures et du compartiment myéloïde Anomalies des lymphocytes B	Growney et al., 2005

Table 1.4. Phénotypes des différents modèles murins (embryonnaires et adultes) avec délétions homozygotes (-/-) ou hétérozygotes (+/-) de *Runx1*.

En résumé, ces différentes études ont permis de démontrer le rôle de *Runx1* lors du développement de l'hématopoïèse définitive et lors de l'émergence, du maintien et de l'expansion des CSH chez l'embryon. Chez l'adulte, *Runx1* agit plutôt comme un régulateur négatif de l'expansion des CSH et des progéniteurs myéloïdes qui contrôle davantage la différenciation terminale des lymphocytes T et la maturation des mégacaryocytes.

1.6 Anomalies génétiques récurrentes impliquant *RUNX1*

Le gène *RUNX1* se démarque par son implication dans un nombre important de néoplasies hématologiques primaires et secondaires, autant chez l'adulte que chez

l'enfant. Plus spécifiquement, *RUNXI* est réarrangé par translocations chromosomiques dans les LAM, les LAL des lignées B et T, les SMD, les leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC), les leucémies myéloïdes chroniques en phase blastique (LMC-PB) et les t-LAM/SMD. *RUNXI* est aussi amplifié dans la LAL de l'enfant et il est délété (délétion germinale ou somatique) ou muté (mutation ponctuelle germinale ou somatique) dans le syndrome FPD et dans différentes hémopathies malignes (Beridexheimer et al., 2008; Shinawi et al., 2008; van der Crabben et al., 2010; Grossmann et al., 2011a).

Des 57 régions chromosomiques transloquées avec *RUNXI* actuellement décrites, trente et un partenaires/régions génomiques ont été clonés. Les gènes *RUNXIT1* « Runt-related transcription factor 1 ; Translocated to, 1 » et *ETV6* « Ets variant gene 6 », respectivement réarrangés dans les translocations t(8;21)(q22;q22) des LAM et t(12;21)(p13;q22) des LAL-B, représentent les partenaires les plus fréquents et les mieux étudiés. Les translocations t(3;21)(q26;q22)/fusion *RUNXI-MECOM/MDS1-EVII*, t(16;21)(q24;q22)/fusion *RUNXI-CBFA2T3/MTG16* et t(1;21)(p36;q22)/fusion *RUNXI-PRDM16* sont aussi des réarrangements récurrents, mais plus rares dans l'ensemble.

1.6.1 La translocation t(12;21)(p13;q22) et la fusion *ETV6-RUNX1*

La translocation t(12;21)(p13;q22) définit le plus grand groupe génétique de LAL à précurseurs B chez l'enfant (25 %) et cette anomalie est associée à un excellent pronostic (94-96 % de survie globale à 5 ans) (Forestier et al., 2008; Moorman et al., 2010). Toutefois, la t(12;21)(p13;q22) est une anomalie plutôt rare chez l'adulte (~2 %) et son impact pronostique demeure incertain (Burmeister et al., 2010).

La t(12;21)(p13;q22) est une translocation cryptique qui fut décrite pour la première fois en 1995 par Golub et collaborateurs dans deux cas de LAL-B de l'enfant (Golub et al., 1995). La caractérisation de cette translocation a permis d'identifier une fusion du gène *RUNX1* et du gène *ETV6* (ou *TEL*), lequel avait auparavant été identifié comme un partenaire de fusion du gène *PDGFRB* « platelet derived growth factor receptor beta » dans la t(5;12)(q33;p13) de la LMMC (Golub et al., 1994). *ETV6* est réarrangé avec plus de 28 partenaires incluant diverses protéines kinases (*PDGFRB*, *ABL1*, *JAK2*, *NTRK3*, etc.) et facteurs de transcription (*RUNX1*, *MECOM*, *PAX5*, etc.) et ce, dans un large spectre de cancers hématologiques et de tumeurs solides (Bohlander 2005; Knezevich 2005).

ETV6 (240 kb, 452 acides aminés) possède huit exons qui codent pour un facteur de transcription nucléaire de la famille ETS « E-26 transformation-specific » (Poirel et al., 1997). Ce facteur de transcription possède un domaine HLH « Helix-Loop-Helix » en position N-terminale qui lui confère une capacité d'homo/hétéro-oligomérisation et la

possibilité de recruter des co-répresseurs dont mSIN3A (Fenrick et al., 1999). ETV6 possède un domaine central de répression transcriptionnelle (CR) permettant le recrutement de co-répresseurs de la transcription tels NCoR, HDAC3 et SMRT et exprime un domaine ETS hautement conservé de 80 acides aminés en position C-terminale (Fig. 1.6B). Le domaine ETS permet la liaison à l'ADN au niveau des séquences consensus contenant un motif « GGAA/T » et favorise les interactions avec diverses protéines. Finalement, un signal NLS est décrit dans la partie C-terminale de la protéine, au niveau des résidus 332 à 452 (Park et al., 2006). ETV6 est essentiel pour le développement vasculaire chez l'embryon et est requis dans le développement de l'hématopoïèse définitive (Wang et al., 1997; Hock et al., 2004; Ciau-Uitz et al., 2010).

Lors de la t(12;21)(p13;q22), l'exon 5 de *ETV6* est fusionné à l'exon 2 de *RUNX1*, produisant un gène de fusion *ETV6-RUNX1* exprimé sous le contrôle du promoteur de *ETV6*. Les points de cassure génomique de *ETV6* sont regroupés presque exclusivement à l'intérieur de l'intron 5 tandis que la plupart des points de cassure de *RUNX1* sont distribués à l'intérieur du vaste intron 1 (160 kb) (Fig. 1.6A) (von Goessel et al., 2009).

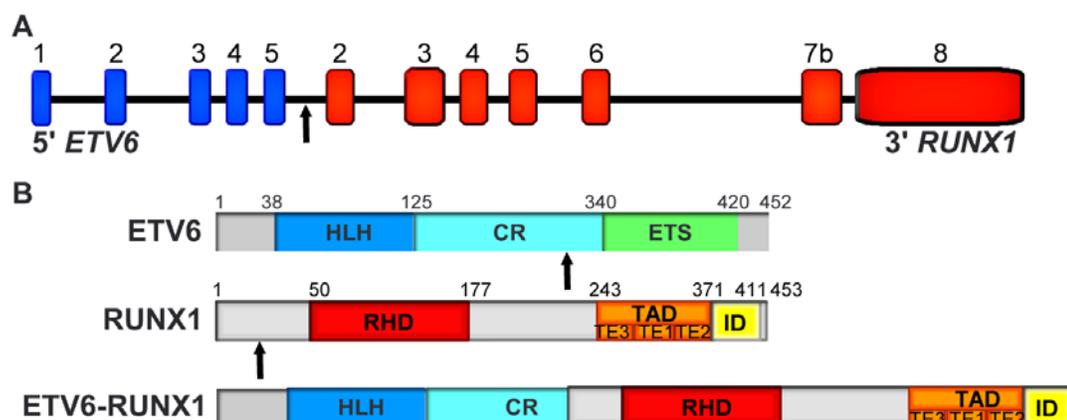


Figure 1.6. Représentation schématique du gène de fusion *ETV6-RUNX1*, des protéines sauvages *ETV6* et *RUNX1* et de la chimère de fusion *ETV6-RUNX1*. (A) Le gène *ETV6-RUNX1* fusionne l'exon 5 de *ETV6* à l'exon 2 de *RUNX1*. Les points de cassures génomiques sont localisés dans l'intron 5 de *ETV6* et l'intron 1 de *RUNX1*. Une flèche indique le point de cassure de la t(12;21)(p13;q22). (B) Les protéines sauvages *ETV6* et *RUNX1* sont représentées ainsi que le produit de fusion *ETV6-RUNX1*. Les flèches indiquent les points de cassure de la t(12;21)(p13;q22). HLH, domaine « helix-loop-helix » ; CR, domaine central de répression transcriptionnelle ; ETS, domaine ETS ; RHD, domaine « Runt homology domain » ; TAD, domaine d'activation transcriptionnelle composé des trois sous-régions d'activation TE1 à 3 ; ID, domaine de répression transcriptionnelle.

Suite à la translocation, le domaine de répression transcriptionnelle CR de *ETV6* est séparé du domaine ETS de liaison à l'ADN et fusionné à la presque totalité de la protéine *RUNX1*. La fusion *ETV6-RUNX1* exprime donc les domaines HLH et CR de *ETV6* reconnus pour l'oligomérisation et le recrutement de co-répresseurs ainsi que les domaines RHD et TAD/ID de *RUNX1* qui confèrent une capacité de liaison à l'ADN au niveau des cibles de *RUNX1* et un potentiel de régulation transcriptionnelle (Fig. 1.6B). Malgré la présence des NLS et NMTS de *RUNX1* au sein de la protéine de fusion, il a

été démontré que l'expression de la chimère ETV6-RUNX1 est dirigée par la portion N-terminale de ETV6, laquelle permet une expression cytoplasmique de la fusion (796 acides aminés ; 97 kDa) (Rho et al., 2002). En raison de cette délocalisation cellulaire, les fonctions nucléaires de ces deux facteurs de transcription (RUNX1 et ETV6) sont altérées (Rho et al., 2002; Rho JK 2002; Park et al., 2006). Ainsi, plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la réduction du pouvoir d'activation transcriptionnelle de RUNX1 au niveau de certains gènes cibles suite à l'expression de cette fusion (Fears et al., 1997; Fenrick et al., 1999; Uchida et al., 1999; Lee et al., 2004). L'explication la plus répandue est certainement la conversion de la protéine RUNX1 d'un activateur en un répresseur transcriptionnel capable de recruter des co-répresseurs tels que mSIN3a et SMRT/NCoR via la portion de ETV6 exprimée par la chimère (Morrow et al., 2007). Le second mécanisme oncogénique discuté implique le domaine HLH qui confère à la chimère une capacité d'homo/hétéro-oligomérisation. L'hétérodimérisation de la chimère avec ETV6 sauvage, avec d'autres copies de la protéine chimérique ou avec des co-activateurs de RUNX1 tel p300 peut mener à une séquestration cytoplasmique ou à une délocalisation des co-activateurs de RUNX1 sauvage et ainsi interférer avec les fonctions nucléaires des protéines ETV6 et/ou RUNX1 sauvages (Rho et al., 2002; Lee et al., 2004). En effet, la perte de fonction de ETV6 sauvage semble être un mécanisme qui collabore avec la fusion ETV6-RUNX1 dans les leucémies avec t(12;21)(p13;q22). Ceci est appuyé par la détection d'une délétion de l'allèle *ETV6* sauvage dans plus de 60 à 70 % des cas, représentant l'un des évènements secondaires les plus fréquemment associés à cette fusion. En définitive, l'ensemble de ces études démontrent que les

domaines HLH, CR et RHD de la chimère ETV6-RUNX1 sont requis pour la transformation, supportant que le recrutement de co-répresseurs, la liaison aux séquences consensus de *RUNX1* et l'homo/hétéro-oligomérisation soient des mécanismes oncogéniques importants de cette fusion (Morrow et al., 2007).

ETV6-RUNX1 est une fusion distincte de tous les autres réarrangements de *RUNX1* d'abord puisqu'elle s'exprime par le promoteur de *ETV6*, contrairement à la majorité des gènes de fusion qui s'expriment par le promoteur de *RUNX1*. De plus, cette fusion représente une anomalie hautement spécifique des LAL-B, contrairement à la plupart des autres anomalies de *RUNX1* qui sont majoritairement retrouvées dans des néoplasies myéloïdes.

Une origine *in utero* a été démontrée pour cette fusion (Ford et al., 1998; Wiemels et al., 1999). *ETV6-RUNX1* est aussi détectée dans le sang périphérique et dans les cellules de sang de cordon d'individus normaux, suggérant que l'expression seule de la fusion soit essentielle, mais non suffisante au développement de la leucémie (Mori et al., 2002; Olsen et al., 2006). Contrairement aux fusions *MLL-ENL* et *MLL-MLLT3/AF9* qui induisent rapidement des leucémies dans les modèles murins suite à une expression rétrovirale, l'expression de la fusion *ETV6-RUNX1* requiert un long temps de latence, confirmant l'importance des anomalies additionnelles (Cozzio et al., 2003; Morrow et al., 2004). Ceci est aussi supporté par l'apparition des LAL-B avec t(12;21)(p13;q22) à des âges plus avancés chez l'enfant (2-5 ans) alors que les leucémies avec réarrangement

de *MLL* se développent plus tôt après la naissance chez le nourrisson (< 1 an). La latence requise par la fusion *ETV6-RUNX1* afin d'initier le développement d'une leucémie, autant chez l'humain que chez la souris, suggère que la fusion puisse produire un clone pré-leucémique persistant capable de se convertir en oncogène suite à l'acquisition d'évènements moléculaires additionnels tels que la délétion secondaire de l'allèle *ETV6* normal (Bernardin et al., 2002; Fischer et al., 2005; Mullighan et al., 2007). Une étude réalisée chez des jumelles monozygotiques, dont l'une était atteinte de LAL-B avec une $t(12;21)(p13;q22)$ et une délétion de l'allèle *ETV6* et l'autre était porteuse de la fusion *ETV6-RUNX1*, mais sans leucémie, a permis de démontrer ce concept de clone pré-leucémique chez l'humain (Hong et al., 2008). En effet, une population unique de cellules $CD34^+CD38^{-/low}CD19^+$, n'existant que chez les individus partageant la fusion *ETV6-RUNX1*, était détectée. Cette population possiblement pré-leucémique était capable de reconstituer le compartiment hématopoïétique d'une souris receveuse NOD/SCID « NonObese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency » primaire et secondaire, de se maintenir et de générer une population plus mature de cellules $CD38^+/CD19^+$, démontrant une capacité d'auto-renouvellement et un potentiel de différenciation associés à cette population cellulaire unique présentant la fusion *ETV6-RUNX1*. Cette étude a donc permis de démontrer que la fusion *ETV6-RUNX1* est importante pour la leucémogénèse chez l'humain et de proposer que la chimère puisse générer un réservoir de cellules souches pré-leucémiques aptes à la transformation, mais incapable d'achever, à elle seule, le processus de transformation (Hong et al., 2008).

Ce concept de cellules pré-leucémiques a aussi été étudié en utilisant des modèles murins de type « knock-in » exprimant une copie de la fusion *ETV6-RUNXI*. Contrairement aux modèles murins « knock-in » exprimant les fusions *RUNXI-RUNX1T1* et *CBFB-MYH11*, l'expression de *ETV6-RUNXI* chez la souris est viable et permet le développement normal des lymphocytes B dans l'embryon (Castilla et al., 1996; Yergeau et al., 1997; Schindler et al., 2009; van der Weyden et al., 2011). L'expression hétérozygote de *ETV6-RUNXI* dans ce modèle mène à une légère augmentation de la capacité d'auto-renouvellement des CSH et à plus long terme, affecte l'émergence des progéniteurs B précoces à partir des CSH sans toutefois altérer la maturation de la lignée B (Schindler et al., 2009). L'expression de *ETV6-RUNXI* engendre une importante diminution des progéniteurs lymphoïdes et des cellules lymphoïdes plus matures et une augmentation des progéniteurs myéloïdes et des LT-CSH (Schindler et al., 2009). Ces souris « knock-in » ne présentent aucun phénotype apparenté à la perte homozygote de *ETV6* ou de *RUNXI*, suggérant que la chimère *ETV6-RUNX1* ne fonctionne pas comme un inhibiteur dominant négatif des fonctions de *ETV6* ni de *RUNX1* (van der Weyden et al., 2011). Sur le plan fonctionnel, la fusion ne bloque pas le processus de maturation des lymphocytes B, mais perturbe plutôt la différenciation de la CSH en progéniteurs lymphoïdes précoces. La fusion modulerait donc subtilement, sur une période déterminée, le nombre de CSH dans la moelle osseuse créant ainsi très tôt dans le développement, un réservoir de cellules prédisposées à la transformation qui avec le temps, pourrait s'épuiser ou se transformer avec l'acquisition d'autres anomalies (Schindler et al., 2009).

À ce jour, un seul modèle murin exprimant la fusion *ETV6-RUNXI* sous le promoteur endogène de *Etv6* est capable de récapituler le phénotype B de la maladie (van der Weyden et al., 2011). Des sites d'insertions ciblant des gènes spécifiques au développement de la lignée B ont été identifiés par l'utilisation d'un système de transposon, démontrant pour la première fois que les mutations secondaires ciblant des gènes contribuant à la lymphopoïèse B puissent être des événements clés dans la pathogenèse des LAL-B avec fusion *ETV6-RUNXI*. Malgré tout, notre compréhension des mécanismes oncogéniques de cette fusion demeure limitée.

1.6.2 La translocation $t(8;21)(q22;q22)$ et la fusion *RUNXI-RUNX1T1/ETO*

Les LAM avec anomalies du CBF, incluant la $t(8;21)(q22;q22)$ et l' $inv(16)(p13.1q22)$ ou plus rarement la $t(16;16)(p13.1;q22)$, sont des entités définies par la présence de l'anomalie génétique, et ce, même si le décompte de blastes médullaires est inférieur à 20 % (Swerdlow et al., 2008). La $t(8;21)(q22;q22)$ et l' $inv(16)(p13.1q22)$ sont des anomalies fréquentes, représentant environ 5 à 8 % des LAM *de novo*, et sont associées principalement à la LAM de type M2 et M4Eo respectivement. La survie globale de ces anomalies s'est grandement améliorée par l'introduction de cycles à hautes doses de cytarabine dans la thérapie actuelle des LAM avec anomalies du CBF [61 % pour la $t(8;21)(q22;q22)$ et 55 % pour l' $inv(16)(p13q22)$] (Byrd et al., 1999). Or, malgré le

pronostic favorable de ces anomalies, un risque de rechute significativement plus élevé est détecté chez les patients présentant des mutations du gène *C-KIT* (~20-30 % des LAM avec anomalies du CBF), plus particulièrement chez les patients exprimant une $t(8;21)(q22;q22)$ (Cairoli et al., 2006; Paschka et al., 2006; Park et al., 2011).

Malgré la description de la $t(8;21)(q22;q22)$ dès 1973 (Rowley 1973), les gènes impliqués dans cette anomalie n'ont été identifiés qu'au début des années 1990 (Gao et al., 1991; Miyoshi et al., 1991; Erickson et al., 1992), révélant un réarrangement de *RUNX1* et de *RUNX1T1* (anciennement *ETO* « Eight twenty one »). À l'opposé de *ETV6* qui est central à la pathogenèse de plusieurs cancers, *RUNX1T1* ne possède aucun autre partenaire de translocation identifié à ce jour.

Le gène *RUNX1T1* (140 kb) possède 16 exons qui codent pour un facteur de transcription nucléaire de la famille ETO (forme la plus longue : 604 acides aminés). *RUNX1T1* partage avec les deux autres membres de cette famille (*MTG16* et *MTGR1*), quatre domaines hautement conservés nommés NHR « Nery homology region » (Davis et al., 2003). Le domaine NHR1 partage une homologie avec les protéines TAF « TATA box binding protein associated factor » (acides aminés 120-201) tandis que le domaine NHR2 est reconnu pour son potentiel d'homo/hétéro-oligomérisation avec les autres membres de la famille ETO et pour ses interactions avec des co-répresseurs de la transcription tels *mSIN3A*, *HDAC1* et *HDAC3* (acides aminés 337-383). Les domaines NHR3 (acides aminés 443-492) et NHR4 (acides aminés 515-555) réalisent également

des interactions entre protéines, via un domaine « coiled-coil » et deux motifs en doigt de zinc respectivement (Fig. 1.7B) (Davis et al., 2003). Le domaine NHR4 permet également le recrutement de co-répresseurs de la transcription tels NCoR, SMRT, HDAC1 et HDAC2, ce qui appuie la fonction de répresseur transcriptionnel associée à RUNX1T1 (Wang et al., 1998).

Suite à la t(8;21)(q22;q22), l'exon 5 de *RUNX1* est fusionné avec l'exon 2 de *RUNX1T1*, générant le gène chimérique de fusion *RUNX1-RUNX1T1*. Les points de cassure génomique sont localisés majoritairement au sein de l'intron 5 de *RUNX1* et dans l'intron 1a ou 1b de *RUNX1T1* (Fig. 1.7A). Pour chacun des deux gènes, trois régions de cassure ou BCR « breakpoint cluster region » regroupent la majorité des points de cassure de cette translocation (Xiao et al., 2001; Zhang et al., 2002).

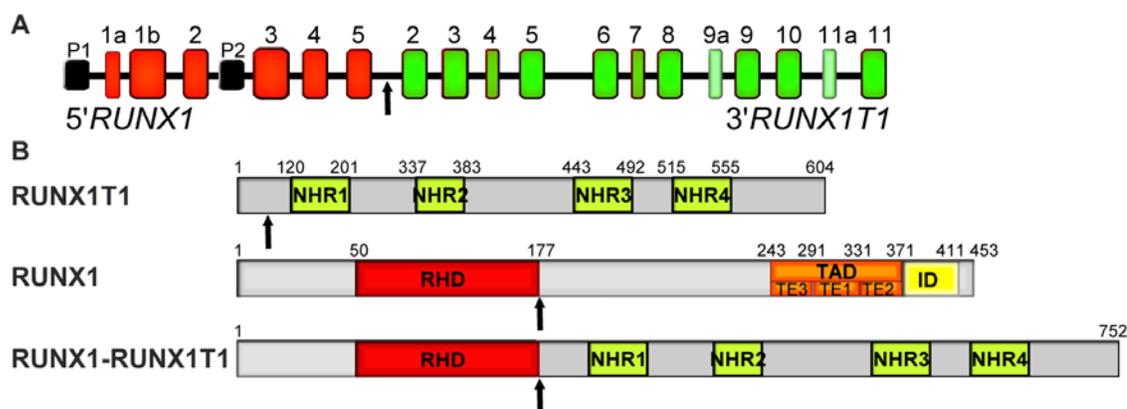


Figure 1.7. Représentation schématique du gène de fusion *RUNX1-RUNX1T1*, des protéines sauvages *RUNX1T1* et *RUNX1* et de la chimère de fusion *RUNX1-RUNX1T1*. (A) Représentation schématique du gène de fusion *RUNX1-RUNX1T1*, montrant la fusion entre l'exon 5 de *RUNX1* (rouge) et l'exon 2 de *RUNX1T1* (vert).

Une flèche indique le point de cassure des deux gènes. (B) Représentation schématique des protéines sauvages RUNX1 et RUNX1T1 et de la protéine de fusion RUNX1-RUNX1T1 avec son domaine RHD « Runt homology domain » et ses quatre domaines « Nervy homology domain » (NHR1 à NHR4). Les flèches indiquent la position des points de cassure.

La fusion principale respecte le cadre de lecture et produit une protéine chimérique RUNX1-RUNX1T1 de 752 acides aminés exprimant le domaine RHD de RUNX1 et la presque totalité de la protéine RUNX1T1, incluant ses quatre domaines NHR1 à NHR4 (95 kDa) (Fig. 1.7B). Lors de la fusion, RUNX1 perd son signal NMTS, mais conserve son signal NLS situé immédiatement suite au RHD. De plus, il acquiert deux NMTS via RUNX1T1, ce qui engendre une relocalisation de la fusion dans des foci nucléaires divergents de RUNX1 sauvage (McNeil et al., 1999; Barseguian et al., 2002). La conservation du domaine RHD confère à la chimère une capacité de liaison à l'ADN au niveau des séquences consensus de RUNX1, un potentiel d'hétérodimérisation avec CBFβ et la possibilité d'interagir avec d'autres facteurs de transcription tels CEBPA, SPI1 et/ou GATA1 (Peterson and Zhang 2004). La préservation des quatre domaines NHR dans la fusion rend possible l'oligomérisation de RUNX1-RUNX1T1 et la formation de complexes homo-tétramériques (Wichmann et al., 2010). Enfin, les domaines NHR2 et NHR4 de RUNX1T1 confèrent aussi un pouvoir répressif à la protéine de fusion. Dû à la nature répressive de RUNX1T1, il a été proposé que la fusion puisse agir tel un facteur de transcription aberrant capable de réprimer les cibles de transcription dépendantes de RUNX1 (Peterson and Zhang 2004).

Ce mécanisme de répression transcriptionnelle a été appuyé par l'étude des modèles murins « knock-in » exprimant la fusion *RUNX1-RUNX1T1* ou *CBFB-MYH11*, lesquels décédaient au jour E12.5-13.5 des suites d'hémorragies massives au niveau du système nerveux central. Puisque ces souris présentaient un phénotype très proche de la perte homozygote de *RUNX1* ou de *CBFB* (Okuda et al., 1996; Sasaki et al., 1996), il a été proposé que l'expression d'une fusion du CBF puisse bloquer les fonctions normales de *RUNX1* de façon dominante négative (Castilla et al., 1996; Yergeau et al., 1997). Ce mécanisme était aussi supporté par l'analyse des profils d'expression de plusieurs cibles endogènes de *RUNX1* qui démontraient une répression transcriptionnelle suite à l'expression de la fusion *RUNX1-RUNX1T1*. Toutefois, d'autres études démontrant que l'expression de *RUNX1-RUNX1T1* mène aussi à une activation de cibles dépendantes et indépendantes de *RUNX1* ont ensuite permis de proposer que la fusion puisse plutôt agir tel un facteur de transcription aberrant capable de déréguler le réseau transcriptionnel de *RUNX1* (Frank et al., 1995; Klampfer et al., 1996; Linggi et al., 2002; Alcalay et al., 2003; Muller-Tidow et al., 2004; Peterson et al., 2007b).

Le potentiel d'homo-oligomérisation conféré par le domaine NHR2 de *RUNX1T1* est un mécanisme oncogénique largement discuté pour cette fusion puisque le domaine NHR2 est conservé par l'ensemble des chimères décrites à ce jour, incluant les isoformes plus courtes tronquées et la forme 9a (Liu et al., 2006; Yan et al., 2006; Yan et al., 2009). Il a été démontré que la capacité d'homo-oligomérisation (formation d'homo-tétramères)

plutôt que le recrutement de co-répresseurs soit déterminante à l'activité transformante de la fusion (Kwok et al., 2009). De façon intéressante, ce pouvoir d'homooligomérisation est aussi un mécanisme proposé pour d'autres fusions telles que ETV6-RUNX1, PML-RARA, BCR-ABL1 et certaines fusions MLL (Lee et al., 2004; Kwok et al., 2006; Krivtsov and Armstrong 2007). En somme, la co-expression des domaines RHD et NHR2 est essentielle à l'activité transformante de cette fusion et ces domaines semblent conférer un gain de fonction à RUNX1-RUNX1T1 lui permettant de réaliser une vaste gamme d'effets incluant la dérégulation du réseau transcriptionnel de RUNX1.

Sur le plan fonctionnel, l'expression de RUNX1-RUNX1T1 engendre de multiples effets cellulaires. Divers modèles ont montré un rôle de la fusion dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'augmentation de l'apoptose lorsque celle-ci était exprimée dans des progéniteurs engagés (Mulloy et al., 2002; Nimer and Moore 2004). Ces effets négatifs sur la croissance cellulaire, contradictoires avec le potentiel leucémogénique, dépendent spécifiquement du type cellulaire. En effet, *RUNX1-RUNX1T1* favorise plutôt l'expansion et/ou l'auto-renouvellement des cellules CD34⁺ et des CSH au détriment de la différenciation et prolonge leur durée de vie sans générer de leucémie ou sans affecter le potentiel de différenciation multilignée, menant ultimement à l'accumulation de cellules myéloïdes immatures plutôt qu'à un arrêt de maturation des cellules myéloïdes (Higuchi et al., 2002; Mulloy et al., 2002; Nimer and Moore 2004). Ainsi, l'idée que la fusion RUNX1-RUNX1T1 puisse mener à l'accumulation de cellules pré-leucémiques, tel que discuté pour la fusion ETV6-RUNX1, pourrait aussi s'appliquer.

En accord avec ce concept, les modèles murins exprimant cette fusion ne développent pas de leucémie spontanément, démontrant la nécessité d'évènements génétiques additionnels et la faible nature oncogénique de la fusion (Peterson et al., 2007a). Ce faible pouvoir transformant de la fusion est aussi appuyé par la détection de la fusion *RUNX1-RUNX1T1* dans les cellules sanguines d'individus normaux et par la persistance de la fusion chez des patients en rémission à long terme (Miyamoto et al., 2000). Or, le développement rapide d'une leucémie a aussi été rapporté chez la souris suite à la co-expression de la fusion avec des formes tronquées et plus courtes n'arborant que les domaines NHR1 et NHR2 de *RUNX1T1* (par exemple : forme *RUNX1-RUNX1T19a*) (Yan et al., 2006). L'accélération de la leucémogénèse a aussi été décrite suite à la co-expression d'anomalies secondaires ou suite à l'exposition à des agents mutagènes tel que le ENU « N-nitroso-N-éthylurée » (Yan et al., 2004; Yan et al., 2006), démontrant la nécessité d'une coopération entre divers évènements afin de promouvoir la leucémogénèse dérivée de la fusion *RUNX1-RUNX1T1*.

1.6.3 La translocation *t(3;21)(q26;q22)* et la fusion *RUNX1-MECOM/MDS1-EVII*

La translocation *t(3;21)(q26;q22)* est une anomalie relativement rare, mais récurrente des SMD, LAM, LMC-PB et t-SMD/LAM. Sur le plan clinique, la *t(3;21)(q26;q22)* est souvent associée à un taux normal ou élevé de plaquettes dans le sang périphérique et à

un pronostic défavorable (anomalies 3q21~26 excluant la t(3;5)(q21~25;q31~35) et inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) : survie à 10 ans de 11,3 %) (Grimwade et al., 2001; Grimwade et al., 2010; Lugthart et al., 2010). La t(3;21)(q26;q22) a d'abord été décrite en 1987 par l'équipe du Dre Rowley dans trois cas de LMC-PB puis a été clonée par une équipe japonaise, révélant l'implication de *RUNX1* et du locus *MDS1/EVII* (*MECOM*), localisé à la bande chromosomique 3q26.2 (Rubin et al., 1987; Mitani et al., 1994).

Le gène *EVII* « Ecotropic Viral Integration site-1 » a initialement été découvert en tant que site fréquent d'intégration rétrovirale dans les tumeurs myéloïdes chez la souris (Mucenski et al., 1988). Une forme plus longue résultant de la fusion de *MDS1* et de *EVII*, nommée *MECOM/MDS1-EVII*, a été identifiée par la suite chez des patients avec la t(3;21)(q26;q22) (Fears et al., 1996). Cette longue forme code pour un domaine conservé de 188 acides aminés nommé domaine PR « PRD1-BF1 and RIZ homology », lequel est exprimé par les membres de la famille PRDM (Fig. 1.8B). *MECOM* ainsi que *EVII* possèdent dix motifs en doigt de zinc organisés en deux domaines de liaison à l'ADN (ZF1 et ZF2) respectivement localisés dans la partie N-terminale et C-terminale de la protéine (Fig. 1.8B). Ces motifs ZF1 et ZF2 favorisent l'oligomérisation ainsi que le recrutement de co-activateurs et de co-répresseurs de la transcription, permettant à *MECOM* et à *EVII* d'agir tel des régulateurs transcriptionnels (Senyuk et al., 2005; Maki et al., 2008). *MECOM* et *EVII* contiennent un domaine de liaison au co-répresseur CtBP (CtBP) qui favorise le recrutement successif de CtBP et d'autres répresseurs tels

SMAD3 et HDACs ainsi qu'une région acide (AD) dont la fonction n'est pas bien définie (Fig. 1.8B). Cette famille de protéines à domaine PR est reconnue pour ses rôles contradictoires dans la régulation de la croissance cellulaire et de la tumorigenèse. Ainsi, selon l'expression ou non du domaine PR (PR⁺, MECOM ou PR⁻, EVI1), l'isoforme s'associe à des fonctions opposées de tumeur suppresseur ou d'oncogène, respectivement.

Suite à la t(3;21)(q26;q22), l'exon 5, 6 ou 7 de *RUNXI* est fusionné à la région 5' de *EVII*, permettant l'expression d'une variété de gènes de fusion (Fig. 1.8A). *RUNXI* peut aussi être fusionné à *MDS1* seul, à *EVII* seul ou à *MECOM* (Fig. 1.8A-1.8B) (Fears et al., 1996).

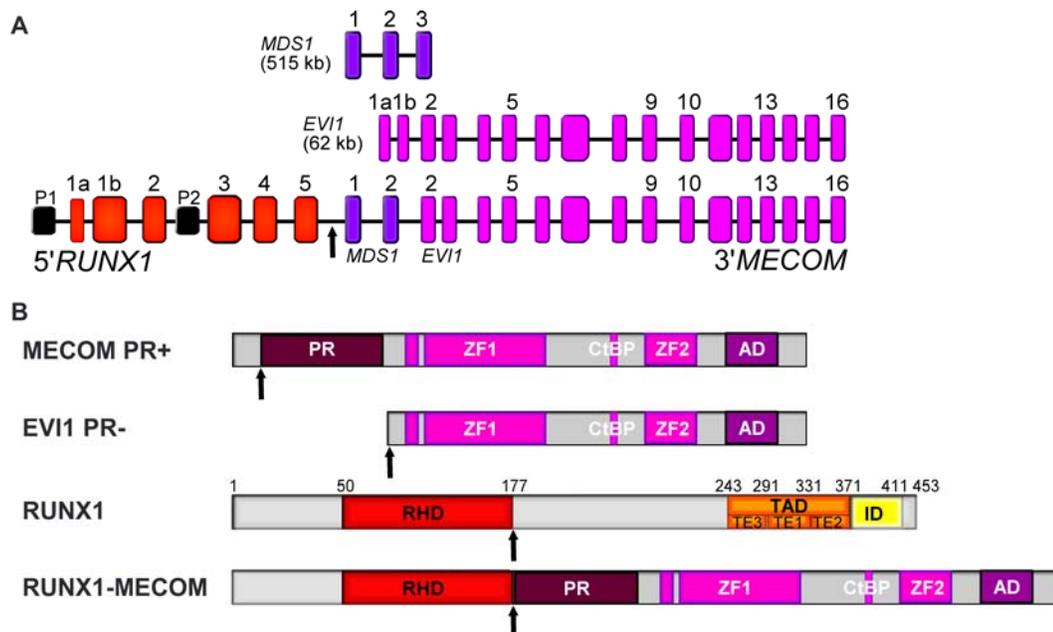


Figure 1.8. Représentation schématique des gènes *MDS1* et *EVII* sauvages, du gène de fusion *RUNX1-MECOM/MDS1-EVII*, des protéines MECOM, EVI1 et RUNX1 sauvages et de la chimère de fusion RUNX1-MECOM. (A) Représentation des gènes *MDS1* (3 exons, 515 kb) et *EVII* (16 exons, 62 kb) sauvages et du gène chimérique de fusion *RUNX1-MECOM*, résultant d'une fusion de la partie 5' du gène *MECOM* à l'exon 5 de *RUNX1*. (B) Structure protéique de MECOM/MDS1-EVII (PR+), de EVI1 (PR-) et de RUNX1 sauvages et de la chimère de fusion RUNX1-MECOM. La fusion conserve le domaine RHD « Runt homology domain » de RUNX1 et le domaine PR « PRD1-BF1-RIZ1 domain », les deux domaines en doigts de zinc ZF1 et ZF2, le domaine de liaison à CtBP et la région acide AD de MECOM. Les flèches indiquent la localisation des points de cassure sur le gène de fusion *RUNX1-MECOM* et sur les protéines.

La fusion RUNX1-MECOM exprime le domaine RHD de RUNX1, lequel est fusionné à la presque totalité de la protéine MECOM. La fusion acquiert le domaine PR, les deux domaines ZF, le domaine CtBP et la région AD de MECOM (Fig. 1.8B) (Mitani 2004). La conservation de ces domaines permet à RUNX1-MECOM de s'exprimer dans le noyau, de lier l'ADN, de s'hétérodimériser avec CBFβ, de s'homo-oligomériser et de réprimer l'expression des cibles de RUNX1 par le recrutement de complexes répresseurs via le domaine CtBP (Izutsu K 2002; Mitani 2004; Senyuk et al., 2005). Les fusions RUNX1-MECOM et RUNX1-EVI1 partagent également la capacité d'homo-oligomérisation (Nitta et al., 2005; Senyuk V 2005), un mécanisme oncogénique important pour les fusions RUNX1. Cependant, le rôle précis de l'oligomérisation n'est pas encore élucidé pour ces fusions.

Puisque certaines cibles de RUNX1 sont réprimées suite à l'expression de la fusion RUNX1-MECOM, il a été proposé que MECOM puisse également convertir RUNX1 d'un activateur à un répresseur transcriptionnel (Zent et al., 1996b). Tel que décrit pour la fusion RUNX1-RUNX1T1, le potentiel répresseur et l'activité dominante négative associés à cette fusion découlent des premiers modèles murins générés qui suggéraient des similitudes avec le modèle murin « knock-out » de *Runx1*. En effet, les souris « knock-in » pour la fusion *RUNX1-EVII* décèdent précocement au jour embryonnaire E12.5-14.5 d'hémorragies massives au niveau du système nerveux central, des suites d'une hématopoïèse définitive déficiente (Maki et al., 2005). Un nombre augmenté de progéniteurs multilignés est aussi décrit dans ce modèle, rappelant les modèles de la fusion *RUNX1-RUNX1T1*. Toutefois, la production de granulocytes et de mégacaryocytes dysplasiques ainsi que l'incapacité des progéniteurs à générer des cellules érythroïdes sont des caractéristiques spécifiques à ce modèle (Maki et al., 2005).

L'expression de *EVII* est faible dans les cellules hématopoïétiques normales. Une surexpression de *EVII* (incluant les différentes formes d'épissage) a été décrite dans les cellules hématopoïétiques de patients atteints de SMD/LAM avec ou sans anomalie de la bande 3q26 et cette surexpression pourrait contribuer à la transformation leucémique. La surexpression de *EVII* entraîne une prolifération cellulaire augmentée et une activité anti-apoptotique, étant conforme à ses propriétés oncogéniques, et s'associe à un pronostic défavorable dans les LAM (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al., 2003; Lugthart et al., 2008; Groschel et al., 2010). Cet oncogène stimule la

prolifération en augmentant l'activité du régulateur transcriptionnel AP1 « activator protein 1 » et antagonise la voie anti-proliférative dépendante du TGF β « transforming growth factor beta » afin d'augmenter la prolifération des blastes leucémiques (Kurokawa et al., 1998; Maki et al., 2008). EVI1 inhibe aussi l'apoptose via une répression de la signalisation directe par JNK « c-Jun N-terminal kinase » et altère le processus de différenciation en diminuant la capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription CEBPA (Helbling et al., 2004; Tokita et al., 2007; Maki et al., 2008). Plusieurs propriétés de EVI1 sont partagées par les fusions RUNX1-MECOM et RUNX1-EVI1 (Maki et al., 2008).

L'expression rétrovirale de *RUNX1-EVII* dans des cellules murines de moelle osseuse permet la transformation des CSH LSK (Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺) et induit le développement de leucémie lorsque transplantées dans une souris. Cependant, ni la surexpression de *EVII* ni la délétion seule de *RUNX1* ni la combinaison des deux permet l'immortalisation des cellules, suggérant qu'une fusion du RHD de RUNX1 à la presque totalité de EVI1 possède un effet additionnel à la simple perte de *RUNX1* et la surexpression de *EVII* (Takeshita M 2008). Malgré que RUNX1-EVI1 possède un potentiel oncogénique plus important que la fusion RUNX1-RUNX1T1, la fusion nécessite quand même un long temps de latence pour induire la leucémie, suggérant la nécessité de mutations génétiques additionnelles (Cuenco et al., 2000; Cuenco and Ren 2001; Cuenco and Ren 2004; Maki et al., 2006; Watanabe-Okochi et al., 2008). Contrairement à *ETV6-RUNX1*

et *RUNX1-RUNXIT1*, le gène de fusion *RUNX1-EVII* n'est pas détecté *in utero* ni dans les cellules sanguines d'individus adultes normaux (Mikhail et al., 2006).

En résumé, *RUNX1-MECOM* est une fusion multifonctionnelle capable de déréguler la prolifération, la différenciation et l'apoptose des CSH ainsi que les fonctions normales de *RUNX1*. Afin d'acquies son potentiel transformant, la fusion doit exprimer le domaine RHD de *RUNX1* et les domaines CtBP, AD, ZF1 et ZF2 de *MECOM* ou de *EVII* afin d'agir tel un régulateur transcriptionnel aberrant.

1.6.4 Mutations et haploinsuffisance de *RUNX1*

En plus d'être réarrangé par translocation, *RUNX1* est aussi une cible de mutations somatiques dans une variété de néoplasies hématologiques incluant les SMD (13,8 %), les leucémies aiguës non-promyélocyaires *de novo* (préférentiellement M0 et M2 : 13,2 à 37 %), les LMMC (37 %), les néoplasies myéloprolifératives/syndromes myélodysplasiques (NMP/SMD) (14 %) et les LAL-T (18 %) (Kuo et al., 2009; Tang et al., 2009; Dicker et al., 2010; Ernst et al., 2010; Gaidzik et al., 2011; Grossmann et al., 2011a; Schnittger et al., 2011). Les mutations de *RUNX1* sont encore plus fréquentes dans les t-LAM/SMD (16-40 %) (Christiansen et al., 2004; Zharlyganova et al., 2008; Harada and Harada 2009). Ces mutations sont associées à la présence des trisomies 8 et 13, de duplication partielle en tandem de *MLL* (*MLL-PTD*) et aux mutations des gènes *IDH1/2* du groupe de LAM à caryotype normal. Elles sont rarement décrites dans les

LAM avec anomalies de pronostic favorable, incluant les anomalies du CBF, la $t(15;17)(q24;q21)$ et les mutations de *NPM1* (Tang et al., 2009; Gaidzik et al., 2011).

Les mutations monoalléliques ou bialléliques de *RUNX1* ciblent davantage les régions codant pour les domaines RHD (exons 3 et 4) et TAD/ID (exon 8) de la protéine. Les mutations ciblant le RHD affectent les résidus clés établissant le contact avec l'ADN causant une perte ou une réduction de la capacité de liaison à l'ADN ou bien abolissent la liaison à l'ADN et le potentiel de transactivation par la délétion partielle ou complète du RHD (Harada and Harada 2009). Les mutations identifiées dans le domaine TAD/ID engendrent soit une terminaison anormale de la protéine et l'apparition de protéines tronquées, rappelant l'isoforme RUNX1a, ou altèrent le pouvoir de transactivation du domaine TAD/ID suite à un décalage du cadre de lecture en position C-terminale (Harada and Harada 2009). Ces derniers mutants sont reconnus pour leur capacité supérieure de liaison à l'ADN (fonction dominante négative présumée) et ont en commun la perte du domaine de régulation transcriptionnelle (Harada and Harada 2009). En résumé, chacune de ces mutations entraîne une condition d'haploinsuffisance de *RUNX1* qui peut compromettre la fonction physiologique de cet important régulateur, pouvant ainsi contribuer au développement d'une variété de néoplasies hématologiques.

1.7. Étiologie des réarrangements chromosomiques

Globalement, les translocations chromosomiques ont deux finalités. Elles peuvent d'abord déréguler l'expression d'un proto-oncogène par la juxtaposition d'une séquence codante devant un puissant élément régulateur. Tel est le cas de plusieurs translocations associées aux LAL des lignées T et B. Par exemple, la $t(8;14)(q24;q32)$ juxtapose l'oncogène *MYC* devant les séquences régulatrices du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (*IGH*) (fusion *IGH-MYC*) et engendre une surexpression aberrante de *MYC* dans les lymphocytes B. Ceci est également vrai pour les gènes *LMO1/2*, *TAL1/2*, *LYL1* et *TLX1/3* qui sont juxtaposés aux séquences régulatrices des gènes du récepteur des cellules T (*TCR*) dans les LAL-T, menant à la surexpression de ces oncogènes. La seconde conséquence d'une translocation chromosomique est la création d'un gène chimérique de fusion, tel que discuté pour les fusions *RUNX1*. Or, pour que les réarrangements chromosomiques apparaissent dans une cellule, des conditions spécifiques doivent être remplies (Fig. 1.9) (Mani and Chinnaiyan 2010).



Nature Reviews | Genetics

Figure 1.9. Quatre grandes catégories de stimuli pouvant induire des réarrangements chromosomiques. Chacune de ces grandes catégories (proximité spatiale, stress cellulaire, recombinaison erronée et motifs de l'ADN) regroupent divers éléments participant à la genèse des anomalies chromosomiques. Figure reproduite et adaptée avec permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Genetics, Mani and Chinnaiyan, Nat Rev Genet. 2010 Dec;11(12):819-29., copyright 2010.

1.7.1 Proximité spatiale

Pour qu'une région d'ADN soit réarrangée, le segment à joindre doit être situé à proximité de la séquence primaire subissant la recombinaison. Il est maintenant reconnu que chaque chromosome occupe un espace distinct dans le noyau que l'on nomme

territoire chromosomique. À l'intérieur de ces territoires, les différents segments chromosomiques sont organisés en fonction de la taille des chromosomes, de la densité en gènes et du niveau global d'expression de la région chromosomique. Ces territoires sont des structures dynamiques capables de se déplacer par des mouvements intrachromosomiques et interchromosomiques (Lanctot et al., 2007). Ce repositionnement dynamique des chromosomes est particulièrement d'intérêt dans le domaine des réarrangements chromosomiques. Quelques observations récentes concernant les positions respectives des chromosomes impliqués dans certaines translocations militent en faveur d'un positionnement non aléatoire des chromosomes les uns par rapport aux autres. Plus spécifiquement, on observe des distances variables entre deux gènes d'un type cellulaire à l'autre, suggérant que la position relative des gènes varie en fonction du type cellulaire étudié, de son stade dans le cycle cellulaire et de son stade de différenciation et/ou de maturation. Notamment, les gènes *IGH* et *MYC* sont près l'un de l'autre dans les lymphocytes B (Osborne et al., 2007). Ceci est également vrai pour les gènes *BCR* et *ABL1* dans les progéniteurs précoces $CD34^+$ et pour les gènes *PML* et *RARA* dans les précurseurs myéloïdes engagés (Neves et al., 1999).

Les régions chromosomiques se déplacent également en fonction de leur niveau d'expression. L'équipe de Osborne et collaborateurs a suggéré que les gènes étaient dynamiquement recrutés vers des sites d'activation transcriptionnelle et que la majorité de ces gènes pouvaient entrer et sortir de ces sites afin d'activer leur transcription (Osborne et al., 2004), démontrant ainsi un mouvement des gènes actifs. Ces

déplacements, régulés par le degré d'expression d'un locus, favorisent la proximité de deux loci non apparentés et nous permettent de comprendre pourquoi certains loci sont près l'un de l'autre dans certaines circonstances. Les mouvements chromosomiques peuvent aussi être induits par des hormones dont l'œstrogène et l'androgène (Mani et al., 2009). Par exemple, l'exposition de la lignée de cancer de la prostate LnCaP à l'androgène engendre une proximité spatiale entre un gène régulé par les androgènes (exemple, *TMPRSS2*) et des membres de la famille ETS (exemple, *ERG* et *ETV1*) lesquels sont fréquemment réarrangés dans ce type de cancer (Lin et al., 2009; Mani et al., 2009).

1.7.2 Stress cellulaire

La proximité spatiale des loci n'induit pas à elle seule les réarrangements chromosomiques. Afin de créer ces réarrangements, des bris double-brins (DSB) à l'ADN sont nécessaires et sont à l'origine des anomalies chromosomiques. Les bris peuvent être générés par des sources exogènes telles que les radiations, les rayons ultraviolets (UV) et les composés chimiques (stress génotoxique) ou par des sources endogènes telles que certaines enzymes du métabolisme (réplication et transcription) et les radicaux libres (stress oxydatif) (Fig. 1.9). Idéalement, ces cassures sont réparées puisqu'elles sont néfastes pour la cellule. Toutefois, si les cassures sont trop nombreuses, la cellule doit être éliminée par le déclenchement de l'apoptose. Dans

certains cas, les DSB sont réparés de façon erronée ce qui permet l'apparition de réarrangements chromosomiques.

1.7.3 Réparation erronée de l'ADN

Dans les cellules de mammifères, la réparation des DSB se fait globalement de deux façons : par recombinaison homologue ou par recombinaison de type jonction des extrémités non-homologues (NHEJ). Le choix du mécanisme de recombinaison dépend de la nature du bris et du stade du cycle cellulaire (G1, S, G2 ou M).

1.7.3.1 La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est un mécanisme très précis qui utilise la chromatide sœur apparentée afin de réparer une cassure. Dû à son mécanisme, la recombinaison homologue ne survient que lors des phases S, G2 et M où une telle chromatide sœur est disponible. La recombinaison homologue est rarement discutée dans la genèse des translocations chromosomiques dans les leucémies puisque peu d'évidence supporte l'implication de ce mécanisme. En fait, pour qu'il y ait recombinaison homologue entre deux brins non apparentés, une parfaite homologie de séquence doit se retrouver de part et d'autre des points de cassure (Agarwal et al., 2006). Les séquences répétées de type ALU représentent quelques rares éléments associés à une recombinaison homologue donnant naissance à des réarrangements chromosomiques. La recombinaison via des éléments ALU a été suggérée dans quelques cas de LMC avec t(9;22)(q34;q11.2)

(Mattarucchi et al., 2008). Ce type de recombinaison a davantage été discuté dans les duplications en tandem du gène *MLL* (*MLL-PTD*) dans les LAM (Strout et al., 1998) et dans les duplications en tandem du gène *MYB* dans les LAL-T (O'Neil et al., 2007). Dans ces cas, un élément ALU est identifié directement au site de duplication, suggérant une recombinaison homologue entre les chromatides soeurs.

1.7.3.2 La recombinaison non-homologue de type NHEJ

La recombinaison non-homologue de type NHEJ est le mécanisme de réparation le plus utilisé dans les cellules de mammifères puisque ce type de réparation survient particulièrement au stade G0/G1 et implique une recombinaison de deux extrémités d'ADN ne partageant aucune ou une très faible homologie de séquences (Weterings and Chen 2008). La recombinaison NHEJ est utilisée dans plusieurs processus physiologiques dont les processus menant à l'émergence d'une vaste gamme de récepteurs antigéniques des lymphocytes B (chaîne lourde des immunoglobulines : *IGH*) et des lymphocytes T (récepteur des cellules T : *TCR*) (Fig. 1.9). Ce type de recombinaison est impliqué dans la réparation des DSB induits de façon contrôlée lors des mécanismes physiologiques de recombinaison VDJ, de commutation de classe et d'hypermutation somatique.

Lors de la recombinaison VDJ, des DSB sont introduits par le complexe d'enzymes recombinases RAG (*RAG1/RAG2*) dans des séquences RSS « recombination signal

sequences » adjacentes aux segments V (Variable), D (Diversité) ou J (Jonction) des immunoglobulines et des TCR. Les RSS consistent en une séquence heptamère (5'-CACAGTG) séparée par 12 ou 23 nucléotides dits « spacer » d'une séquence nonamère (5'-ACAAAACC). Ainsi, à l'aide du mécanisme de NHEJ, une recombinaison entre une séquence RSS ayant une séquence « spacer » de 12 nucléotides et une séquence RSS ayant une séquence « spacer » de 23 nucléotides sera permise, favorisant l'émergence de jonctions V-D-J diversifiées et l'apparition d'IgH exprimant le segment constant mu ($C\mu$). Suite à l'assemblage de l'IgH à une chaîne légère kappa ou lambda, les premiers anticorps fonctionnels IgM seront exprimés à la surface du lymphocyte B. La chaîne bêta du TCR est également soumise à la recombinaison VDJ via un mécanisme similaire.

Au cours de sa maturation, le lymphocyte B peut exprimer d'autres sous-classes d'immunoglobulines nécessitant le remplacement de sa chaîne $C\mu$ par d'autres segments constants ($C\delta$, $C\gamma$, $C\epsilon$ ou $C\alpha$). Le processus de commutation de classe permet l'excision du segment $C\mu$ à échanger grâce à la formation d'une boucle de délétion qui est générée par l'introduction de cassures à l'ADN. Ces cassures sont induites par l'enzyme AICDA « Activation-Induced Cytidine DeAminase » au niveau des régions S « Switch », lesquelles possèdent un rôle apparenté à celui des séquences RSS. Enfin, le processus d'hypermutation somatique aura pour fonction de générer une grande diversité d'anticorps de haute affinité par l'introduction, via AICDA, de mésappariements de l'ADN dans les régions variables (V) des immunoglobulines. La recombinaison NHEJ

engendre une dégradation ou un remodelage des extrémités à lier, favorisant l'apparition d'une grande variété de récepteurs antigéniques. Ainsi, des délétions, duplications, insertions ou inversions de nucléotides surviennent généralement au niveau des jonctions nouvellement formées par ce mécanisme (Weterings and Chen 2008).

Le dérèglement de ces trois différents processus physiologiques peut mener à l'apparition de translocations chromosomiques, comme par exemple, les translocations récurrentes des LAL et des lymphomes impliquant les gènes *IGH* ou *TCR*. Ces mécanismes ont été proposés suite à la détection de séquences RSS ou de régions S à proximité des points de cassure des translocations. Par exemple, des pseudo-séquences RSS retrouvées dans certains oncogènes impliqués dans la pathogenèse des LAL-T tels *LMO2* et *TALI* seraient traitées par les enzymes RAG1/2 comme de véritables RSS, menant à une recombinaison VDJ illégitime entre ces séquences et les séquences des *TCR*. Une fusion de deux gènes non-*TCR* portant ces pseudo-RSS (*STIL* et *TALI*) a été décrite comme un mécanisme possible générant la délétion 1p32 détectée dans 20 à 30 % des LAL-T (Lieber et al., 2006; Zhang and Swanson 2008). Un rôle de l'enzyme AICDA est particulièrement suspecté dans la genèse de la t(8;14)(q24;q32)/fusion *IGH-MYC* du lymphome de Burkitt. *MYC* peut être transloqué avec des régions S ou V des immunoglobulines, suggérant l'implication de l'enzyme AICDA dans la genèse de ces translocations (Unniraman and Schatz 2006; Dorsett et al., 2007; Robbiani et al., 2008). Enfin, une récente publication propose également un rôle de AICDA dans la genèse des

fusions récurrentes *TMPRSS2-ERG* et *TMPRSS2-ETV1* du cancer de la prostate (Lin et al., 2009).

1.7.4 Motifs de l'ADN

1.7.4.1. L'implication des enzymes topoisomérases de type II dans les leucémies

La TOP2 est une enzyme dont la fonction est d'assurer l'accessibilité de la chromatine par la régulation de la topologie de l'ADN. La formation d'un homodimère TOP2 permet l'introduction d'un premier bris simple brin contrôlé dans l'ADN puis d'un second bris à quatre bases d'intervalle, sur le brin opposé, de façon à permettre le déroulement et la relaxation de l'ADN enroulé. Normalement, ces bris sont tolérés à de faible niveau dans la cellule et sont rapidement réparés par une étape subséquente de ligation (Figs. 1.10A-1.10B). Ces étapes de coupure et de ligation permettent la formation d'un intermédiaire de réaction nommé complexe de clivage lequel consiste en un brin d'ADN lié de façon covalente à l'enzyme. Généralement, les TOP2 permettent la ligation presque parfaite des deux extrémités avec très peu d'ajout de nucléotides (4 et moins) au point de ligation dû à la conservation d'une superposition de 4 nucléotides entre les deux extrémités (Felix et al., 2006).

Les enzymes TOP2 sont essentielles à la condensation des chromosomes, à la transcription, à la réplication de l'ADN et au processus d'apoptose (Pommier et al., 2010). Ces enzymes se lient préférentiellement, via des séquences consensus (5' A/G N

T/C N N C N N G T/C N G G/T T N T/C N T/C 3'), aux régions d'ADN permissives à la transcription que l'on nomme des S/MARs « scaffold/matrix attachment regions » (Spitzner and Muller 1988; Sperry et al., 1989; Broeker et al., 1996). Ces régions d'environ 200 paires de base (pb) sont riches en dinucléotides A-T et ne sont pas associées aux nucléosomes, représentant des régions de chromatine libre sensibles aux nucléases et plus fragiles en raison des nombreuses protéines qui y interagissent. Il semble que la structure de l'ADN plutôt qu'une séquence consensus soit préférentiellement reconnue comme site de clivage des TOP2. Or, la séquence consensus dégénérée est encore largement utilisée afin de prédire les sites de clivages *in vitro* de l'enzyme.

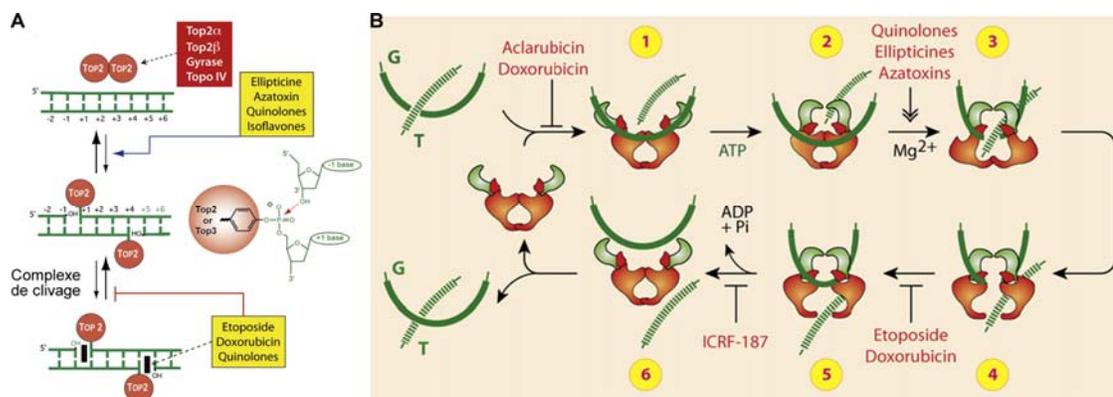


Figure 1.10. Mécanisme d'action de la topoisomérase II (TOP2). (A) Le dimère TOP2 introduit des bris simple brin à quatre nucléotides d'intervalle sur deux brins opposés. Les inhibiteurs de la TOP2 (étoposide ou doxorubicine) favorisent la stabilisation des complexes intermédiaires en inhibant la résolution des complexes de clivage. Certains autres agents chimiques (quinolone ou isoflavone) favorisent l'introduction de bris et augmentent ainsi les réactions de clivage par le dimère TOP2. (B) Mécanisme de résolution de la structure enroulée de l'ADN par le dimère TOP2 via

l'introduction de bris contrôlés dans l'ADN. L'utilisation d'inhibiteurs de la TOP2 (doxorubicine ou étoposide) interfère avec le cycle catalytique normal et empêche la ligation de l'ADN (étapes 4-5). Figures reproduites et adaptées avec la permission de Elsevier, *Chemistry and Biology*, 17(5), Pommier et al., « DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs », 421-33, copyright 2010.

Les drogues ciblant et inhibant les TOP2 sont fréquemment utilisées dans le traitement de divers cancers. Les inhibiteurs de la TOP2 agissent en stabilisant les complexes de clivage, empêchant ainsi la résolution des bris par ligation. Lorsque la fourche de réplication atteint un tel complexe de clivage, l'intermédiaire est reconnu et transformé en un DSB permanent. Si les bris se forment en trop grande quantité, des signaux apoptotiques se déclenchent menant à la mort de la cellule. Pour une cellule à réplication rapide telle une cellule cancéreuse, un nombre trop important de DSB entraîne le déclenchement d'apoptose massive. L'initiation de l'apoptose correspond à l'objectif ultime des chimiothérapies à l'aide des inhibiteurs de la TOP2 (McClendon and Osheroff 2007). Cependant, ces DSB peuvent également être réparés et mener à la création d'aberrations chromosomiques. Toutefois, les mécanismes menant à l'apparition de ces anomalies sont encore très controversés et mal compris (Joannides and Grimwade 2010).

La formation de translocations grâce au complexe ADN/TOP2 est un concept discuté dans la littérature. Suivant la stabilisation des complexes intermédiaires par des inhibiteurs de la TOP2, des translocations pourraient survenir suite à un échange de

matériel entre deux monomères ADN/TOP2 et une ligation incorporant un minimum de variation de séquences (Zhou et al., 1997; Aplan 2006a; Felix et al., 2006). Des évidences de ce modèle existent dans la genèse de la fusion *NUP98-TOP1* résultant de la $t(11;20)(p15;q11)$ des leucémies secondaires (Ahuja et al., 2000) et de certains réarrangements de *MLL* retrouvés dans les t-LAM (Lovett et al., 2001; Langer et al., 2003). En effet, des sites de clivage des TOP2 sont souvent retrouvés à l'intérieur ou très près des points de cassure des réarrangements de *MLL* dans les leucémies secondaires aux inhibiteurs de la TOP2 (Langer et al., 2003; Aplan 2006b). Ces réarrangements de nature secondaire présentent généralement de plus petites délétions et duplications que les réarrangements de *MLL* des leucémies *de novo* (Lovett et al., 2001; Langer et al., 2003; Whitmarsh et al., 2003). Or, ces évidences ne sont rapportées que dans un petit nombre de patients, supportant qu'un autre mécanisme, possiblement plus fréquent puisse générer les autres réarrangements de *MLL*.

En effet, d'autres études analysant les jonctions résultant des translocations $t(4;11)(q21;q23)/MLL$ et $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1$ des leucémies *de novo* ont révélé des jonctions de haute complexité avec des microhomologies et des délétions, duplications ou insertions allant d'une simple base à plusieurs pb (Raffini et al., 2002; Zhang and Rowley 2006). Ces jonctions plus complexes, retrouvées dans un nombre beaucoup plus important de cas, supportent l'existence d'un second mécanisme. Ainsi, une hypothèse voulant qu'une recombinaison illégitime de type NHEJ soit impliquée dans la genèse de ces translocations *de novo* a été proposée (Xiao et al., 2001; Zhang et al., 2002). La

recombinaison NHEJ pourrait réaliser le remodelage extensif d'extrémités non-homologues et générer des délétions, des additions de nucléotides ou d'autres modifications qui caractérisent ce type de recombinaison à la jonction des gènes fusionnés. Cette seconde hypothèse pourrait expliquer certains des réarrangements de *MLL* et de *RUNX1* observés dans les leucémies *de novo* qui présentent ce type de jonction plus complexe et qui portent ces marques caractéristiques du NHEJ (Aplan 2006b). Malgré ces évidences, les mécanismes exacts à l'origine des translocations *de novo* et secondaires de *MLL* et/ou de *RUNX1* sont encore à identifier avec certitude.

L'étude des différents points de cassure des fusions *MLL* des leucémies *de novo* et des leucémies secondaires aux inhibiteurs TOP2 appuie l'hypothèse que des mécanismes distincts soient impliqués dans la genèse des translocations détectées dans ces deux types de leucémie. Mentionnons d'abord que la génomique des translocations *MLL* est la mieux étudiée, expliquant la nature des exemples fournis. Le gène *MLL* possède un BCR de 8,3 kb couvrant les exons 8 à 14 lequel regroupe la majorité des points de cassure des t(4;11)(q21;q23) des leucémies *de novo* du nourrisson et des leucémies secondaires suite à un traitement. Selon la nature de la leucémie (*de novo* versus secondaire), le point de cassure de *MLL* varie. En effet, les leucémies secondaires possèdent des cassures plus fréquentes dans la portion 3' du BCR (exon 12) alors que les leucémies *de novo* de l'enfant et de l'adulte présentent des cassures qui sont davantage localisées dans la portion 5' du BCR (exons 9 et 10) (Broeker et al., 1996), supportant la présence de

mécanismes différents à l'origine des translocations chromosomiques des leucémies *de novo* et/ou des leucémies secondaires.

1.7.4.2 Structure non-bêta de l'ADN et séquence de répétition simple

Enfin, d'autres éléments de l'ADN sont retenus comme des causes possibles de réarrangements chromosomiques. Dépendant de la nature des séquences, l'ADN peut adopter une structure transitoire autre que sa structure normale bêta et devenir plus fragile. Cette structure dite non-bêta est formée par des séquences répétées [répétition de purines (A/G)/pyrimidines (T/C/U)] ou par des séquences palindromiques. Ce type de structures a été démontré au point de cassure majeur du gène *BCL2* lors de la t(14;18)(q32;q21) des lymphomes folliculaires (Raghavan et al., 2004; Raghavan et al., 2005). De plus, certains auteurs ont identifié des répétitions purines/pyrimidines près des points de cassures de la fusion *ETV6-RUNXI*, cependant des évidences convaincantes sont toujours manquantes (Thandla et al., 1999).

1.8 Mise en contexte de notre travail

Malgré l'avancement de nos connaissances sur les fusions récurrentes *RUNXI-RUNXITI*, *ETV6-RUNXI* et *RUNXI-MECOM*, les translocations plus rares impliquant *RUNXI* demeurent peu étudiées. À ce jour, seulement deux articles font le recensement de neuf et de dix cas respectivement présentant des anomalies plus rares ciblant ce gène,

sans étude approfondie des partenaires impliqués (Slovak et al., 2002; Jeandidier et al., 2006). En raison de ce petit nombre de cas rapportés, les caractéristiques cliniques (association entre la morphologie et le pronostic) et le rôle joué par ces translocations plus rares dans le processus de leucémogénèse demeurent largement inexplorés.

1.8.1 Objectif principal

Ce travail a pour but d'améliorer nos connaissances quant aux réarrangements plus rares de *RUNXI* dans les leucémies de l'adulte, par la description des profils cliniques, par l'étude cytogénétique détaillée et par l'analyse moléculaire de quatre translocations plus rares ciblant *RUNXI*. Par la caractérisation de ces anomalies, nous tenterons de faire ressortir les particularités et/ou les caractéristiques communes de ces translocations afin d'établir des parallèles entre les anomalies récurrentes et plus rares de *RUNXI*.

1.8.2 Objectifs spécifiques

1- Une description clinique détaillée et une caractérisation moléculaire de quatre translocations chromosomiques impliquant le gène *RUNXI* [t(7;21)(p22;q22), t(1;21)(p22;q22), t(8;21)(q23.3;q22), t(15;21)(q26.1;q22)], identifiées chez des patients adultes atteints de leucémie aiguë, seront réalisées (chapitres 3 à 6).

2- Une étude des mécanismes génomiques de formation de deux translocations récurrentes impliquant le gène *RUNX1* permettra de mettre en évidence les mécanismes à l'origine de la $t(7;21)(p22;p22)$, détectée chez un patient atteint de LAM *de novo*, et de la $t(8;21)(q23.3;q22)$, identifiée chez un patient atteint d'une LAM en rechute (chapitres 3 et 5).

3- Enfin, une étude des profils d'expression des cibles de *RUNX1* par qRT-PCR et Western Blot sera réalisée, permettant de révéler les points communs et divergents entre les fusions récurrentes [$t(8;21)(q22;q22)$ et $inv(16)(p13q22)$] et plus rares de *RUNX1* [$t(7;21)(p22;q22)$, $t(1;21)(p22;q22)$, $t(8;21)(q23.3;q22)$, $t(15;21)(q26.1;q22)$ et $t(1;21)(p36;q22)$] (chapitre 7).

CHAPITRE 2

2. Méthodologie

2.1 Cytogénétique standard et moléculaire

2.1.1 Établissement du caryotype en bandes GTG

Le caryotype standard est une technique d'analyse conventionnelle de cytogénétique permettant l'observation et l'étude des vingt-trois paires de chromosomes d'une cellule. L'établissement d'un caryotype à haute résolution pour un échantillon de moelle osseuse ou de sang périphérique nécessite plusieurs étapes incluant : l'isolation des cellules d'intérêt, la mise en culture puis l'obtention, la coloration et l'analyse des chromosomes.

L'isolation des cellules mononuclées par Ficoll-Paque

Afin d'obtenir une préparation chromosomique, nous avons d'abord séparé les cellules mononuclées des prélèvements de moelle osseuse et/ou de sang périphérique totaux collectés chez des patients ayant, au préalable, donné leur consentement. La séparation des cellules mononuclées est permise grâce au milieu Ficoll-PaqueTM (GE Healthcare ; no. cat. 17-1440-03), lequel sépare les cellules en différentes couches. Suite à une centrifugation, les cellules mononuclées vont former une couche blanchâtre, laquelle sera isolée entre une couche supérieure de plasma et une couche inférieure de Ficoll-PaqueTM contenant aussi un culot de granulocytes et d'érythrocytes.

La culture

Les cellules mononuclées (1×10^6 cellules/mL de milieu) sont cultivées à des temps diversifiés (24 à 72 heures) afin de stimuler la division cellulaire et d'optimiser le nombre de cellules en métaphase. Au laboratoire de cytogénétique de la Banque de Cellules Leucémiques du Québec (BCLQ), nous utilisons des milieux adaptés pour la culture des cellules leucémiques : le MarrowMax (Gibco; no. cat. 12260-014) et le RPMI 1640 (Invitrogen ; cat no.11875-093) avec sérum de veau fœtal (SVF) (Hyclone ; cat no. SH-3007103). On ajoute également de la L-glutamine (Invitrogen ; no. cat. 25030-149), un acide aminé essentiel servant de source d'énergie majoritaire aux cellules en division rapide, et un mélange des antibiotiques pénicilline et streptomycine (Invitrogen ; no. cat.15070-063), servant à empêcher la croissance des bactéries gram positives et négatives. Lorsque ces trois composés sont additionnés au milieu sélectionné, il est alors dit « complet ». Les cellules mononuclées sont cultivées en suspension à une température physiologique de 37°C et à un pH contrôlé de 7,2 à 7,4. Elles sont cultivées en haute teneur de dioxyde de carbone (5 % CO₂) et en faible teneur en oxygène (2-5 % O₂).

Dans notre laboratoire, les cultures cellulaires des échantillons de LAM sont réalisées dans des milieux complets (MarrowMax ou RPMI) et dans des milieux additionnés des facteurs de croissance suivants : recombinant humain du « Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor » (GM-CSF) à une concentration finale de 0,01 µg/mL

(Sigma ; no. cat. G5035-5UG), recombinant humain du « Stem Cell Factor » (SCF) (Gibco ; no. cat. PHC2113) à une concentration finale de 50 ng/mL et recombinant humain du « Flt-3 ligand » à une concentration finale de 50 ng/mL (Humanzyme ; no. cat. HZ-1151). Les cultures cellulaires des échantillons de LAL-B sont réalisées dans les milieux complets (MarrowMax ou RPMI) et dans des milieux additionnés des facteurs de croissance suivants : interleukine 7 (Il-7) (Biosource international ; no. cat. PHC0075) à une concentration finale de 2 ng/mL, recombinant humain du SCF à une concentration finale de 50 ng/mL et recombinant humain du « Flt-3 ligand » à une concentration finale de 50 ng/mL. Les cultures cellulaires de MPAL sont réalisées dans quatre milieux de culture complets : RPMI additionné de SVF 20 % (24 heures), milieu additionné des facteurs de croissance servant aux cultures des LAL-B (48 heures), milieu additionné des facteurs de croissance servant aux cultures des LAM (48 heures) et MarrowMax seul (48 heures).

Récolte, étalement et coloration des chromosomes

Afin d'obtenir des préparations chromosomiques, nous ajoutons 50 µL d'actinomycine D à 500 µg/mL (Sigma ; no. cat. A9415) aux milieux, 30 minutes avant la fin de la culture, pour une période de 15 minutes à 37°C. L'actinomycine est un agent intercalant de l'ADN et un anti-mitotique capable de prévenir la contraction des chromosomes durant la métaphase afin de favoriser l'allongement maximal des chromosomes (Barch and Association of Cytogenetic Technologists. 1991). Ensuite, 25 µL de colcémide à 10 µg/mL (Gibco ; no. cat. 15212-012) sont ajoutés aux cellules pour une période de 15

minutes à 37°C. La colcémide est un agent anti-mitotique qui inhibe la formation du fuseau mitotique, favorisant l'obtention d'un nombre maximal de cellules en métaphase (Barch and Association of Cytogenetic Technologists. 1991). Le surnageant contenant ces agents est éliminé à l'aide d'une centrifugation de 8 minutes à 1000 révolutions par minute (rpm). On ajoute alors une solution hypotonique de chlorure de potassium 0,075M (Sigma ; no. cat. P9333-500G) à 37°C pendant 15 minutes. Le choc hypotonique permet le passage de l'eau par osmose et le gonflement des cellules, ce qui favorise un déploiement optimal des chromosomes métaphasiques (Barch and Association of Cytogenetic Technologists. 1991). Suite à une seconde centrifugation de 8 minutes à 1000 rpm, la solution hypotonique et l'excès d'eau sont retirés, permettant la fixation des cellules dans un mélange de carnoy 3:1, composé de méthanol (Produits Chimiques ACP, no. cat. M-3640) et d'acide acétique (J.T. Baker ; no. cat. 9511-02). Deux étapes successives de fixation et de centrifugation sont réalisées. Les préparations chromosomiques sont ensuite conservées à -20°C ou sont étalées sur des lames puis gardées à la température de la pièce afin de permettre un vieillissement des lames.

Le marquage des chromosomes en bandes GTG (bandes G obtenues suite à l'action de la Trypsine et du Giemsa) est la coloration la plus courante. Les bandes GTG marquent des régions d'ADN à réplication tardive et riches en liaisons adénine-thymine qui correspondent à des régions pauvres en gènes actifs. Pour réaliser un marquage GTG, les lames ont été digérées par l'action de la trypsine 2,5 % (Gibco ; no. cat. 15090) puis ont été colorées au Giemsa 4 % (EMD Chemicals; no. cat. 620G-75). La génération d'un

profil de bandes claires et foncées facilite l'identification des chromosomes et l'assemblage du caryotype. Pour chaque spécimen, un minimum de vingt métaphases est analysé et la formule chromosomique est décrite selon les normes établies par le système international de nomenclature de la cytogénétique humaine 2009 (ISCN) (International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. et al., 2009).

2.1.2 Le caryotype spectral (SKY)

Le caryotype spectral (SKY) est une technique de cytogénétique moléculaire basée sur un principe d'hybridation *in situ*. Les sondes, correspondant à une combinaison différente de cinq fluorochromes, permettent l'obtention de 24 couleurs spectrales associées à chaque paire d'autosomes (22) et aux deux chromosomes sexuels.

Pré-traitement à la RNase/Pepsine

Les lames pour le SKY doivent vieillir durant 3 à 4 jours à température pièce et subir, préalablement à l'hybridation, un traitement à la RNase et à la pepsine afin d'éviter la présence de cytoplasme sur les préparations chromosomiques. Le cytoplasme empêche l'hybridation adéquate de la sonde à son ADN complémentaire (ADNc), expliquant la nécessité de dégrader cette composante à l'aide de la désoxyribonucléase I (RNase) (Sigma ; no. cat. D5025) et de l'endoprotéase pepsine (Sigma ; no. cat. P6887).

Pour réaliser ce pré-traitement, nous avons déposé les lames dans une solution à 37°C de RNase et de citrate de sodium 2X (2X SSC) (Sigma ; no. cat. S6639) pendant 45 minutes. Les lames ont ensuite été lavées à trois reprises dans une solution à température pièce de 2X SSC pendant 5 minutes. Une à la fois, les lames ont été immergées dans une solution acide de pepsine (Sigma ; no. cat. 251-2) à 37°C pendant 2 minutes puis ont été lavées, à deux reprises, dans un bain de tampon phosphate salin (PBS 1X) (DiaMedix ; no. cat. 1000-3) à température pièce pendant 5 minutes et dans une solution à température pièce de PBS 1X/MgCl₂ (Sigma-Aldrich ; no. cat. M1028) pendant 5 minutes. Les lames ont été fixées dans une solution de formaldéhyde 1 % (Sigma ; no. cat. F1268) pendant 10 minutes, ont été lavées dans le PBS 1X pendant 5 minutes et ont ensuite été déshydratées pendant 2 minutes dans des bains consécutifs d'alcool 70 %, 80 % et 100 %.

Dénaturation et hybridation

Les lames ont été dénaturées pendant 1 minute dans une solution à 70°C de formamide 70 % (Sigma ; no. cat. F7503)/2X SSC et ont été déshydratées pendant 2 minutes dans trois bains consécutifs d'alcool froid 70 %, 80 % et 100 %. La sonde de caryotype spectral pour l'humain (Applied Spectral Imaging ; vial #1 ASR1001H, SKY000028) a été dénaturée à 80°C pendant 7 minutes, a été incubée pendant 1 heure à 37°C puis a ensuite été déposée sur les lames sèches, lesquelles ont été incubées dans une chambre humide à 37°C pour une période de 36 à 48 heures.

Détection

Pour chaque lame, nous avons réalisé trois lavages consécutifs de 5 minutes dans une solution de formamide 50 %/2X SSC chauffée à 45°C puis avons effectué deux lavages de 5 minutes dans une solution de 1X SSC chauffée à 45°C. Un lavage final de 2 minutes a été effectué dans une solution de 4X SSC/Tween 20 0,1 % (Sigma ; no. cat. P-9416) chauffée à 45°C. Afin de diminuer l'hybridation non-spécifique, une sonde de blocage (vial #2 ASR1002H, SKY000028) a été appliquée sur les lames, lesquelles ont ensuite été incubées pendant 30 minutes à 37°C. Les lames ont été lavées à trois reprises dans la solution de 4X SSC/Tween 20 0,1 % à 45°C pendant 3 minutes. Une première sonde, consistant en une solution « Cy5 Staining Reagent » diluée (vial #3 CAD03, CAD033), a été appliquée sur les lames, lesquelles ont été incubées à 45°C pour une période de 45 minutes. Avant d'appliquer la seconde sonde qui consiste en une solution « Cy5.5 Staining Reagent » diluée (vial #4 CAD04, CAD033), trois lavages successifs de 3 minutes ont été réalisés dans des bains de solution 4X SSC/Tween 20 0,1 % chauffés à 45°C. La période d'incubation de 45 minutes et les trois lavages successifs ont été répétés pour la deuxième sonde. Un bref lavage dans l'eau a été fait avant que les lames soient séchées à l'air, à l'abri de la lumière. Enfin, nous avons appliqué sur la région d'intérêt de chaque lame un contre-colorant « Anti-fade-DAPI Reagent » (vial #5 ASR1005H ; SKY000028).

Analyse microscopique et interprétation

La fluorescence émise par chaque paire de chromosomes a été captée par un système informatique décodant le spectre d'émission fluorescente de chaque chromosome en une seule exposition grâce à un système à filtre triple (Applied Spectral Imaging ; SKY CUBE™). Le système traduit cette fluorescence multiple en assignant une couleur spectrale à chaque paire chromosomique. Le SKY permet la mise en évidence des réarrangements complexes et de certaines translocations et permet aussi la caractérisation des chromosomes marqueurs. Toutefois, les petites délétions/duplications et les inversions ne sont pas détectées par cette technique. L'étude des translocations, des inversions chromosomiques et des délétions géniques peut aussi être réalisée à l'aide de la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et de sondes ciblant des gènes ainsi que des régions plus spécifiques du génome.

2.1.3 L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

La technique de FISH permet de cibler un chromosome, une région ou un gène à l'aide de sondes spécifiques complémentaires à une région donnée. La technique exploite le principe de dénaturation et d'hybridation de l'ADN afin de permettre une hybridation spécifique de la sonde à son ADNc. De façon similaire à la technique de SKY, les lames doivent subir un pré-traitement de 45 minutes dans la solution de RNase et de deux minutes dans la solution acide de pepsine, si jugé nécessaire. Les lames sont ensuite

déshydratées pendant une minute dans des bains consécutifs d'alcool 70 %, 85 % et 100 %.

Hybridation, lavages et détection

La dénaturation de l'ADN de la sonde et de l'ADN des lames a respectivement été réalisée à 73°C pendant 5 minutes et dans un bain de solution de formamide 70 %/2X SSC à 73°C pendant 5 minutes. Les lames ont ensuite été déshydratées pendant une minute dans des bains consécutifs d'alcool 70 %, 85 % et 100 % puis ont été séchées à l'air libre avant l'application de la sonde sur la région d'intérêt. L'étape d'hybridation entre l'ADNc des lames et des sondes a été réalisée à 37°C dans une chambre humide, à l'abri de la lumière, pendant environ 16 heures. Les lames ont été lavées dans une solution de 0,4X SSC/0,3 % de nonidet P40 (NP-40) (Roche ; no. cat. 11754599001) à 73°C pendant un maximum de 2 minutes et ont été lavées dans une solution de 2X SSC/0,1 % de NP-40 à température pièce pour un temps variable, allant de 5 secondes à une minute. Ces lavages permettent l'émergence du signal fluorescent et l'élimination de l'hybridation non-spécifique. Des lavages plus courts, à des températures inférieures à 73°C (moins stringents) peuvent être utilisés selon le type de sonde. Afin de permettre la visualisation des chromosomes métaphasiques et des cellules interphasiques des lames, 10 µL d'une solution de DAPI II (Abbott Molecular; no. cat. 30-804931) ont été ajoutés sur chaque région d'intérêt. Les images de FISH ont été capturées à l'aide du logiciel CytoVision® version 3.6 (Leica Microsystems).

Sondes	Spectrum Orange	Spectrum Vert
RUNX1-RUNX1T1	LSI RUNX1T1 (480 Kb)	LSI RUNX1 (1,3 Mb)
EGR1 (5q31.1-31.3)	LSI EGR1 (200 Kb)	LSI D5S23, D5S721 (450 Kb)
CSF1R (5q33-34)	LSI CSF1R (322 Kb)	LSI D5S23, D5S721 (561 Kb)
CEP7	D7Z1	-
CEP8	-	D8Z2
BCR-ABL1 extra signal	LSI ASS-ABL (650 Kb)	LSI BCR (300 Kb)

Table 2.1. Sondes ayant servi à l'identification des translocations étudiées au cours de ce projet.

Plusieurs sondes de FISH disponibles commercialement chez Abbott Molecular ont été utilisées au cours de ce projet. La sonde « RUNX1-RUNX1T1 dual-color dual fusion » (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, cat. no. 08L70-020) a été utilisée afin de détecter les différents réarrangements de la bande chromosomique 21q22 et de *RUNX1*, tel qu'indiqué par la présence de trois signaux verts sur des chromosomes métaphasiques (locus de *RUNX1* coloré par le spectrum vert : 1,3 Mb). D'autres sondes ainsi que des outils moléculaires complémentaires, tels que des sondes BACs « bacterial artificial chromosomes » et des sondes fosmides, permettant l'étude de régions chromosomiques plus petites et plus précises, ont aussi été utilisées dans le cadre de ce travail (Tables 2.1 et 2.2).

2.1.4 L'extraction de l'ADN de BACs

Les BACs utilisés lors de ce projet représentent des séquences d'ADN spécifiques de 150 à 200 kb contenues dans le vecteur pBACe3.6, lequel contient un facteur F de fertilité qui lui permet de transformer la souche bactérienne *E.Coli DH10*. Lorsque la

bactérie exprime le BAC, elle acquiert la capacité de conjugaison via le facteur F, ce qui favorise l'échange d'ADN entre bactéries, la réplication efficace et l'amplification de la séquence d'intérêt lors des cultures. Le BAC s'insère en une seule copie dans la bactérie, limitant le phénomène de recombinaison entre l'ADN cible et l'ADN bactérien. Les bactéries transformées possèdent également un gène de résistance à l'antibiotique chloramphénicol, favorisant la sélection positive et la survie des bactéries transformées et par la même occasion, la mort de celles non transformées. Les BACs utilisés ont été sélectionnés sur le site « Genome Browser UCSC » (<http://genome.ucsc.edu/>) et fournis par le centre « BACPAC Resources Center » (<http://bacpac.chori.org/>). Ils ont été extraits selon les recommandations du fabricant « BACPAC Resources Center » ou à l'aide des ensembles d'extraction de Qiagen ou de la compagnie Gerard Biotech qui exploitent les mêmes principes que ceux décrits ci-dessous (« Qiagen large-construct kit », no. cat. 12462 ou « Spin doctor BAC prep kit », no. cat. S121L).

Brièvement, les BACs ont été cultivés sur une période moyenne de 16 heures à 37°C, dans 125 mL de milieu de culture LB « lysogeny broth » (Difco™ ; no. cat. 240210) additionné de 12,5 µg/mL de chloramphénicol (Roche Applied Sciences ; no. cat. 634433). Les culots bactériens ont été récupérés suite à une centrifugation de 10 minutes à 5000 rpm puis ont été homogénéisés dans 10 mL de solution P1 [5 mL Tris 1M pH 8.0 (Roche Applied Sciences ; no. cat. 10708976001), 2 mL de EDTA 0,5M à pH 8.0 (Gibco ; no. cat. 15575-038), 93 mL d'eau déionisée et ultrafiltrée, 50 µL de RNase 20 mg/mL]. À l'homogénat, 10 mL de solution P2 [80 mL NaOH 0,25N (Fisher

Scientific ; no. cat. BP359-500), 1 g SDS (MP Biochemicals ; no. cat. 194831) et 20 mL d'eau] ont été ajoutés. Le mélange a été incubé pendant au moins 5 minutes avant que 10 mL de solution P3 [KOAc 3M pH 5.5 (Ambion ; no. cat. AM9610)] y soit ajouté. La solution P3 favorise l'apparition d'un surnageant contenant l'ADN d'intérêt, lequel a été isolé par une centrifugation à 10000 rpm pendant 10 minutes et récupéré par filtration. La précipitation de l'ADN a été permise par l'ajout de 30 mL d'isopropanol froid (Fisher Chemical ; no. cat. A419-1) au surnageant et par une incubation de 5 minutes. À la suite d'une centrifugation de 15 minutes à 9000 rpm, l'ADN a été récupéré, nettoyé avec de l'éthanol 100 % puis suspendu dans du tampon Tris-EDTA 1X.

2.1.5 Marquage par déplacement de coupures

L'ADN extrait a ensuite été marqué par l'addition de fluorochromes, par la technique de déplacement de coupures ou « Nick translation ». En théorie, l'enzyme DNase I permet l'introduction, au hasard, de coupures simples brins ou « nicks » sur le fragment d'ADN d'intérêt. Ces coupures sont réparées grâce à l'activité polymérase de l'ADN polymérase I laquelle incorpore des nucléotides libres et des nucléotides marqués d'UTP à l'ADN. Simultanément, l'activité exonucléase de cette polymérase permet d'enlever les nucléotides non marqués en position 5', ce qui favorise la synthèse de nouveaux fragments fluorescents.

Pour réaliser ce marquage, l'ensemble « Nick translation kit » (Abbott Molecular ; no. cat. 07J00-001) a été utilisé. Nous avons combiné 1 µg d'ADN d'intérêt à 2,5 µL de fluorochrome 0,2 mM (Enzo Life Sciences ; Spectrum vert, no. cat. 02N32-050 et Spectrum orange, no. cat. 02N33-050), 5 µL de dTTP 0,1 mM, 10 µL de désoxyribonucléotides (dNTP) 0,1 mM, 5 µL de tampon de nick translation 10X et 10 µL du mélange d'enzymes. L'eau a ensuite été ajoutée pour atteindre un volume final de 50 µL. Les réactions ont été incubées à 15°C pendant 8 à 16 heures puis les enzymes ont été inactivés à 70°C pendant 10 minutes.

Les sondes marquées ont été récupérées sous forme de précipité par l'ajout de 10 µL d'ADN bloquant COT-1 1 mg/mL (Invitrogen ; no. cat. 15279-011), 30 µL (30 µg) d'ADN bloquant de sperme de saumon (Sigma ; no. cat. D9156-1ML), 9 µL d'acétate de sodium (Sigma ; no. cat. S7670-500g) et 250 µL d'éthanol 100 %. Les réactions ont été placées à -20°C pendant une nuit avant d'être soumises à une centrifugation à 4°C pendant 30 minutes à 12000 rpm. L'ADN a été séché pendant 15 minutes puis a été suspendu dans un volume final de 20 µL de tampon d'hybridation, contenant 6 µL d'eau sans nucléase et 14 µL d'une solution d'hybridation [formamide 100 %, dextran sulfate 50 % (Sigma ; no. cat. D-8906), 20X SSC et eau déionisé et ultrafiltré].

2.1.6 FISH avec des sondes BACs

Le FISH avec des sondes BACs requiert des lavages moins stringents et/ou plus courts que ceux employés avec les sondes commerciales. En effet, plus le signal est petit, plus il est lavé rapidement dû à l'absence de fortes associations entre les deux brins d'ADN.

2.1.7 Marquage des sondes fosmidés avec la biotine

Un fosmide représente une séquence d'ADN généralement de petite taille (~30 à 45 kb) exprimé au sein du vecteur pEpiFOS TM-5. Le fosmide s'apparente fortement au BAC en ce qui a trait au facteur F et au gène de résistance à l'antibiotique chloramphénicol qu'il exprime et à son principe d'intégration en simple copie à l'intérieur des bactéries *E. Coli*. Dû à la petite taille des sondes dérivées de fosmidés (~30 à 45 kb), le signal devient très difficile à visualiser par microscopie lors d'un marquage standard fluorescent. La méthode de marquage « BioNick Labeling system » (Invitrogen ; no. cat. 18247-015), exploitant la très forte affinité de la biotine pour l'avidine, a été utilisée afin de générer un signal plus robuste formé de couches successives d'anticorps fluorescents.

Pour biotinyler l'ADN dérivé de fosmidés, 1 µg d'ADN d'intérêt, 5 µL d'un mélange de dNTP 10X (contenant 0,1 mM de biotin-14-dATP) et 5 µL d'un mélange des enzymes DNase I et ADN polymérase I 10X ont été ajoutés à un volume prédéterminé d'eau afin d'obtenir un volume final de 45 µL. Ces réactions de marquage, utilisant également la méthode de déplacement de coupures, ont été incubées à 15°C pendant une heure, ce qui

a permis l'incorporation des molécules de biotine à l'ADN. Ces réactions ont été arrêtées par l'ajout de 5 μL d'un tampon « stop » composé de EDTA, un chélateur de cations qui inactive les enzymes de la réaction, puis ont été précipitées, tel que décrit précédemment. Un lavage supplémentaire à l'éthanol 70 % et une centrifugation de 5 minutes à 13000 rpm ont été réalisés. Les sondes ont été suspendues dans un volume final de 20 μL de tampon d'hybridation [4 μL d'eau et 16 μL de solution d'hybridation].

2.1.8 FISH avec des sondes fosmides

Tel que pour les autres techniques d'hybridation, un pré-traitement à la RNase/pepsine peut s'avérer nécessaire. La dénaturation de l'ADN des lames a été faite dans une solution de formamide 70 %/2X SSC chauffée à 73°C pendant 5 minutes. Les lames ont été lavées pendant une minute dans deux bains consécutifs de 2X SSC glacé, ont été fixées dans trois bains consécutifs d'alcool glacé 70 %, 85 % et 100 % pendant une minute et ont été séchées à l'air libre. Entre temps, les sondes ont été dénaturées pendant 10 minutes dans un bain d'eau chauffée à 95°C. Les sondes dénaturées ont alors été appliquées sur les régions d'intérêt et les lames ont été incubées à 37°C dans une chambre humide pendant 16 à 20 heures.

Suite à la période d'incubation, les lames ont été lavées pendant environ 30 secondes dans deux bains de formamide 50 %/2X SSC à pH 7.0 chauffée à 37°C. Les lames ont ensuite été lavées pendant environ 30 secondes dans deux bains de tampon 2X SSC

chauffées à 37°C et ont été immergées pendant 10 minutes dans une solution de blocage de PBS/BSA 2 % à température pièce. Le premier anticorps (50 µL) a été appliqué sur la région d'intérêt, laquelle a été recouverte d'un parafilm et les lames ont été incubées pendant 45 minutes à 37°C. Le premier anticorps consiste en une solution de streptavidine couplée au fluorochrome TEXAS RED 1 µg/mL (GE Healthcare ; no. cat. RPN1233V) et diluée à une concentration finale de 0,05 % (4 µL d'anticorps et 5,997 mL de PBS/BSA 1 %). Les lames ont été lavées dans deux bains de solution de lavage PBS/Tween 20 à température pièce pendant 5 minutes. Le second anticorps (50 µL) a été appliqué sur les lames, lesquelles ont été incubées puis lavées, tel que décrit pour le premier anticorps. L'anticorps secondaire correspond à une molécule de biotine couplée à un anti-streptavidine 5 µg/mL (Vector Laboratories ; no. cat. BA-0500) et diluée à une concentration finale de 1 % (4 µL d'anticorps et 396 µL PBS/BSA 0,5 %). Finalement, un troisième anticorps (50 µL) a été appliqué, incubé puis lavé, tel que décrit. Le troisième anticorps consiste en une solution de streptavidine marquée au TEXAS RED 1 µg/mL et diluée à une concentration finale de 0,1 % (1 µL d'anticorps et 999 µL de PBS/BSA 1 %). La superposition de deux couches biotine/streptavidine favorise l'amplification du signal selon une interaction forte et spécifique. Dix µL du contre-colorant DAPI II, additionné d'environ 5 µL d'agent « anti-fade Vectashield » (Vector Laboratories ; no. cat. H-1000), ont finalement été appliqués sur la région d'intérêt afin de visualiser les noyaux et les chromosomes métaphasiques.

Plusieurs sondes BACs et fosmidés ont été utilisées afin de cloner les points de cassures des différentes translocations présentées dans ce manuscrit (Fig. 2.1 et table 2.2). Le BAC RP11-299D9 (139 kb), couvrant les exons 2 à 8 de *RUNXI* et le BAC RP11-771C10 (195 kb), couvrant les exons 7 et 8 et une région en position 3' de *RUNXI*, ont été fréquemment utilisés afin d'étudier les régions plus centromériques de *RUNXI*. Les régions plus télomériques ont été couvertes par le BAC RP11-17020 (142 kb), ciblant l'exon 1, une grande partie de l'intron 1 et une région en 5' de *RUNXI*. Le BAC RP11-100J18 (172 kb), couvrant la partie 5' du gène, l'exon 1 et une partie l'intron 1 de *RUNXI*, a aussi été utilisé.

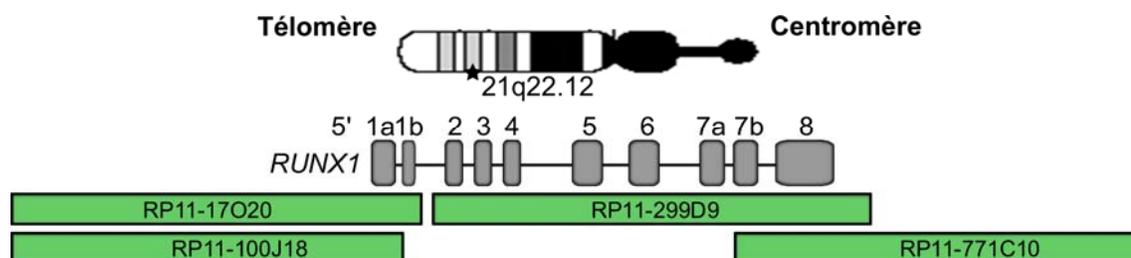


Figure 2.1. Positionnement des sondes « bacterial artificial chromosomes » par rapport au locus *RUNXI* localisé à la bande 21q22.12. L'exon 1 est situé en position télomérique sur le chromosome 21 tandis que l'exon 8 est localisé en position centromérique.

Translocation	BAC/fosmide	Position	Gène
t(7;21)(p22.1;q22)	RP11-299D9	21q22.12	<i>RUNX1</i>
	RP11-771C10	21q22.12	<i>RUNX1</i>
	RP11-1132K14	7p15.2	<i>HOXA</i>
	RP11-692L4	7p21.2	<i>ETV1</i>
	RP11-164P11	7p22.1	<i>USP42</i>
	RP11-90J23	7p22.1	<i>PMS2</i>
	RP11-296K15	7p22.2	<i>NUDT1</i>
	RP11-2K20	7p22.1	<i>USP42</i>
	RP11-805P12	7p22.1	<i>USP42</i>
t(1;21)(p22.3;q22)	RP11-299D9	21q22.12	<i>RUNX1</i>
	RP11-17O20	21q22.12	<i>RUNX1</i>
	RP11-454F23	1p31.1	<i>USP33</i>
	RP11-192G4	1p31.1	<i>COL24A1</i>
	RP11-775P20	1p22.3	<i>CLCA2</i>
	RP11-47F20	1p22.3	<i>CLCA2</i>
t(15;21)(q26.1;q22)	G248P8181C2	21q22.12	<i>RUNX1</i>
	RP11-100J18	21q22.12	<i>RUNX1</i>
	RP11-17O20	21q22.12	<i>RUNX1</i>
	RP11-299D9	21q22.12	<i>RUNX1</i>
	RP11-771C10	21q22.12	<i>RUNX1</i>
	RP11-90E5	15q26.3	<i>ADAMTS17</i>
	RP11-337N12	15q26.2	<i>NR2F2</i>
	RP11-369O17	15q26.1	<i>RGMA</i>
	RP11-79A7	15q26.1	<i>ST8SIA2</i>
	RP11-113M15	15q26.1	<i>SLCO3A1</i>
	RP11-615N7	15q26.1	<i>SLCO3A1</i>
	RP11-24J19	15q26.1	<i>SLCO3A1</i>
	RP11-345O16	15q26.1	-
	RP11-661P17	15q26.1	-
	RP11-378B5	15q26.1	<i>SV2B</i>
	RP11-360F18	15q26.1	<i>CRTC3, BLM</i>
t(8;21)(q23.3;q22)	-	-	-

Table 2.2. Sondes « bacterial artificial chromosomes » (BACs) et fosmides utilisées lors de la caractérisation des t(7;21)(p22.1;q22), t(1;21)(p22.3;q22) et t(15;21)(q26.1;q22). Aucune analyse, à l'aide de sonde BAC, n'a été effectuée pour la t(8;21)(q23.3;q22). La localisation chromosomique et le gène ciblé par chaque sonde sont indiqués.

2.2 Extraction des acides nucléiques

Plusieurs techniques de PCR ont été réalisées sur les spécimens de sang et/ou de moelle osseuse des patients leucémiques évalués au cours de ce projet. À ces fins, les acides nucléiques, soit ribonucléiques (ARN) ou désoxyribonucléiques (ADN), ont été extraits à partir des cellules mononuclées cryopréservées.

2.2.1 Extraction des ARN totaux par le TRIzol™

Les ARN totaux ont été extraits à partir des suspensions cellulaires conservées dans une solution de TRIzol™ (Invitrogen ; no. cat. 15596018), selon le protocole du fournisseur. Brièvement, à 1 mL de cellules homogénéisées dans le TRIzol™, nous avons ajouté 0,2 mL de chloroforme (Sigma ; no. cat. 366919-1L). Suite à un mélange vigoureux, les cellules ont été incubées pour une période de 10 minutes à la température de la pièce afin de permettre la solubilisation des composantes cellulaires dans les différentes phases organiques et aqueuses. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 4°C à une vitesse de 12000 rcf « relative centrifuge force » pendant 15 minutes afin de séparer la phase aqueuse (hydrophilique) contenant les ARN totaux de l'interphase blanchâtre (ADN) et de la phase organique comprenant les composantes hydrophobes (phénol, protéines, lipides). Un volume d'isopropanol (0,5 mL pour 1 mL de TRIzol) a été ajouté et mélangé à la phase aqueuse afin de précipiter les ARN totaux, lesquels ont été récupérés après 5 à 10 minutes d'incubation à température pièce, suite à une centrifugation de 10 minutes à 4°C à une vitesse de 12000 rcf. Les ARN totaux ont été

lavés avec de l'éthanol 75 % (1 mL pour 1 mL de TRIzol) puis ont été suspendus dans un volume pré-déterminé d'eau traité au pyrocarbonate d'éthyle (DEPC ; ~25 à 50 µL). La dissolution de l'ARN a été favorisée par une incubation de 10 à 15 minutes à 60°C.

2.2.2 Extraction de l'ADN génomique par la technique phénol/chloroforme

Un protocole standard d'extraction phénol/chloroforme a été utilisé afin d'extraire l'ADN génomique des cellules leucémiques conservées dans une solution de DMSO (Sigma ; no. cat. D2650) (Sambrook et al., 1989). Brièvement, les cellules ont été incubées à 37°C dans une solution de NaCl/EDTA/protéinase K [2 mL de NaCl 5M (Sigma ; no. cat. S3014-500G), 200 µL de EDTA 0,5M pH 8,0, 200 µL de protéinase K 2 mg/mL (Roche Applied Sciences ; no. cat. 03115879001)] pour une durée de 24 à 48 heures afin de permettre une digestion enzymatique des membranes cellulaires et nucléaires. L'EDTA chélate les cations magnésium requis pour l'activité des DNases, permettant à l'ADN de demeurer intact dans le surnageant. À la fin de la période de digestion, 4 mL d'un mélange (1:1) homogène de phénol (EMD Chemicals; no. cat. 6710) et de chloroforme ont été ajoutés à la suspension cellulaire. Les tubes ont été agités pendant 20 minutes puis soumis à une centrifugation de 10 minutes à 2000 rpm. Quatre mL de chloroforme ont été ajoutés à la phase aqueuse recueillie. Les tubes ont été agités pendant 20 minutes puis ont été centrifugés à 2000 rpm pendant 10 minutes afin de récupérer à nouveau le surnageant. L'ADN a été précipité par l'ajout de 200 µL

d'acétate de sodium 3M à pH 5,2 et de 4 mL d'éthanol 95 % puis il a été nettoyé de toute trace de sel par l'ajout de 500 μ L d'éthanol 70 %. La dissolution de l'ADN dans un volume adéquat de tampon Tris-EDTA 1X a été favorisée par une incubation à 37°C pendant une nuit ou par un chauffage à 55°C pendant environ 2 heures.

2.3 Synthèse de l'ADNc

L'ADNc est un ADN simple brin synthétisé à partir de l'ARN messenger (ARNm) lors d'une réaction de transcription inverse. Au cours de ce projet, nous avons utilisé deux ensembles de synthèse d'ADNc et avons respecté les instructions établies par le fournisseur (Invitrogen : SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR ; no. cat. 11904-018 ou ABI : High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ; no. cat. 4368814).

2.3.1 Synthèse d'ADNc selon le protocole d'Invitrogen

Pour chaque réaction de synthèse, un mélange des réactifs suivants a été réalisé : 2 μ g ARN, 1 μ L de « random hexamers », 1 μ L de 10 nM dNTP et un volume ajusté d'eau DEPC pour atteindre un volume de 10 μ L. Les réactions ont été incubées à 65°C pendant 5 minutes puis ont été mises sur glace pendant au moins une minute. À chaque réaction, 9 μ L du mélange suivant ont été ajoutés : 2 μ L du tampon RT 10X, 4 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 2 μ L de DTT 0,1M et 1 μ L du mélange de l'enzyme recombinante RNaseOUT

et de l'inhibiteur de la ribonucléase. Les réactions ont été incubées à 25°C pendant 2 minutes puis nous avons ajouté 1 µL (50 unités) d'enzyme SuperScript™ II RT à chaque réaction. La synthèse de l'ADNc a été réalisée selon le cycle suivant : 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 42°C et 15 minutes à 70°C. À la fin de la période de synthèse, 1 µL de ribonucléase RNase H a été ajouté puis les réactions ont été incubées à 37°C pendant 20 minutes afin de permettre la dégradation des brins d'ARN résiduels.

2.3.2 Synthèse d'ADNc selon le protocole d'ABI

Pour chaque réaction, un mélange composé de 2 µL de tampon 10X de RT, 0,8 µL de dNTP 25X (100mM), 2 µL de « random primers », 1 µL des enzymes « MultiScribe reverse transcriptase » et un volume ajusté d'eau sans nucléase ont été ajoutés à 2 µg d'ARN pour atteindre un volume final de 20 µL. Les réactions ont été placées dans un thermocycleur et ont été soumises aux conditions suivantes : 10 minutes à 25°C, 120 minutes à 37°C et 5 secondes à 85°C.

2.4 « Polymerase chain reaction » ou PCR et variantes

La technique de « polymerase chain reaction » (PCR) permet l'amplification d'un ADN cible à l'aide d'amorces spécifiques à la région d'intérêt. La PCR permet un dédoublement de l'ADN d'intérêt de façon exponentielle suivant des cycles répétitifs de dénaturation, d'hybridation et d'extension. Au cours de ce projet, les protocoles

accompagnant les trousse de PCR des compagnies Qiagen (HotStar HiFidelity Polymerase Kit ; no. cat. 202602) et Invitrogen (Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity ; no. cat. 11304-011) ont été utilisées afin de réaliser différentes PCR sur de l'ADNc et de l'ADN génomique.

2.4.1. PCR à haute fidélité selon Qiagen

À l'ADN (10-100 ng d'ADNc ou ADN génomique), 10 µL de tampon PCR 5X HotStar HiFidelity, 10 µL de chacune des amorces sens et anti-sens 5 µM, 1 µL d'enzyme HotStar HiFidelity ADN polymérase et un volume ajusté d'eau ont été ajoutés afin d'obtenir un volume final de 50 µL. Les réactions ont été placées dans un thermocycleur selon les conditions générales suivantes : 5 minutes à 95°C suivi de 35 à 40 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, d'hybridation à 55-60°C pendant une minute et d'extension à 72°C ou 68°C pendant une minute par kb de produit à amplifier. Une étape d'extension finale de 10 minutes à 72°C permet de terminer la réaction, laquelle a été conservée à 4°C.

2.4.2 PCR à haute fidélité selon Invitrogen

À environ 100 ng d'ADN génomique, nous avons ajouté 5 µL de tampon PCR 10X High Fidelity, 1 µL du mélange de dNTP 10 mM, 2 µL de MgSO₄ 50 mM, 1 µL de chacune des amorces sens et anti-sens 10 µM, 0,2 µL d'enzyme « Platinum *Taq* High Fidelity »

et un volume ajusté d'eau afin d'obtenir un volume final de 50 µL. Les réactions ont été soumises aux conditions générales suivantes : 2 minutes de dénaturation initiale à 94°C suivi de 35 cycles de dénaturation de 30 secondes à 94°C, d'hybridation de 30 secondes à 60°C et d'extension de 3 minutes à 68°C. Une étape d'extension finale à 68°C pendant un maximum de 10 minutes a aussi été réalisée. Ce protocole a été utilisé afin d'amplifier les jonctions génomiques des fusions *RUNX1-USP42/USP42-RUNX1* et des fusions *RUNX1-TRPS1/TRPS1-RUNX1*. Une liste des différentes amorces utilisées pour l'amplification des jonctions génomiques de chacune de ces fusions est présentée (Tables 2.3-2.5).

Amorce	Gène	Exon/intron	Séquence (5'→3')
RUNX1_int7F	<i>RUNX1</i>	intron 7	CTGCTACAGACTTGGGCTGTTTCT
RUNX1_int7F1	<i>RUNX1</i>	intron 7	CTCAGGGCAAATGAAGCAAGAGGA
RUNX1_int7R	<i>RUNX1</i>	intron 7	ACTGCTGAGCGAATGTCAGGGAAT
RUNX1_int7R1	<i>RUNX1</i>	intron 7	ACCCTGGAGAAGTTCAGGTTTCCTT
USP42_int2R	<i>USP42</i>	intron 2	GCTTGCCCATCTCAATTCTCACCA
USP42_int1F	<i>USP42</i>	intron 1	CTAACGGTAGGGTAAGGAGATTGC

Table 2.3. Séquences des oligonucléotides ayant servi à l'amplification des jonctions génomiques des gènes de fusion *RUNX1-USP42* et *USP42-RUNX1*.

Amorce	Gène	Exon/intron	Séquence (5'→3')
RUNX1_int6_1F	<i>RUNX1</i>	intron 6	TGACCACAAAGCCACAAAGCTTCC
RUNX1_int6_2F	<i>RUNX1</i>	intron 6	ACATCGCTGCTCTGGCTTTCTTTC
RUNX1_int6_R1	<i>RUNX1</i>	intron 6	ACCAAATCTACACCCAGGCATATC
RUNX1_int6_R2	<i>RUNX1</i>	intron 6	CAGCTGACCTGCCCTATGAGAAAT
TRPS1_int2_R	<i>TRPS1</i>	intron 2	TGCATCACAGTGGTCAGATCAGGT
TRPS1_int2_F1	<i>TRPS1</i>	intron 2	TTAAGAAACAGCAGCCACGGAACC
TRPS1_int2_F2	<i>TRPS1</i>	intron 2	TGTGCTTGGCCAGTGTACTTTCT

Table 2.4. Séquences des oligonucléotides ayant servi à l'amplification des jonctions génomiques des gènes de fusion *RUNX1-TRPS1* et *TRPS1-RUNX1*.

2.4.2 La « reverse transcriptase-PCR » (RT-PCR)

La « reverse transcriptase-PCR » est une technique réalisée à l'aide d'une enzyme transcriptase inverse laquelle convertit l'ARN en ADNc. Au cours de ce projet, nous avons utilisé les trousseaux de RT-PCR de Qiagen « QIAGEN OneStep RT-PCR kit » (Qiagen ; no. cat. 210212) et d'Invitrogen « SuperScript® One-step RT-PCR with Platinum *Taq* » (Invitrogen ; no. cat. 10928-042).

2.4.2.1 RT-PCR selon Qiagen

À l'ARN total (~1 à 2 µg), nous avons ajouté 10 µL de tampon Qiagen 5X, 2 µL du mélange de dNTP, 6 µL de chacune des amorces sens et anti-sens 5 µM, 2 µL du mélange des enzymes « Omniscript reverse transcriptase », « Sensiscript reverse transcriptase » et « HotStar *Taq* » ADN polymérase et un volume ajusté d'eau afin d'obtenir un volume final de 50 µL. L'ADNc a été synthétisé à 50°C pendant 30 minutes puis une inactivation des transcriptases inverses et une activation de la *Taq* polymérase ont été réalisées pendant 15 minutes à 95°C. En moyenne, 35 cycles répétitifs de PCR ont été effectués suivant une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 60°C pendant 45 secondes et une extension à 72°C pendant une minute, avec une extension finale de 7 minutes à 72°C.

2.4.2.2 RT-PCR selon Invitrogen

À l'ARN (environ 1 µg), nous avons ajouté 25 µL du mélange réactionnel 2X, 1 µL de chacune des amorces sens et anti-sens 10 µM, 1 µL du mélange des enzymes « Superscript II reverse transcriptase » et « Platinum *Taq* » ADN polymérase et un volume ajusté d'eau distillée afin d'obtenir un volume final de 50 µL. Les réactions de synthèse d'ADNc ont été réalisées pendant 30 minutes à 50°C puis la transcriptase inverse a été inactivée à 94°C pendant 2 minutes. Cette étape a également permis l'activation de la *Taq* polymérase. En moyenne, 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, d'hybridation à 55-60°C pendant 30 secondes et d'élongation à 68-72°C pendant une minute par kb de produit à amplifier et une extension finale de 10 minutes à 72°C ont été réalisés pour chaque expérience.

Une liste des amorces utilisées pour l'amplification des divers gènes de fusion identifiés dans ce manuscrit (*RUNX1-USP42/USP42-RUNX1*, *RUNX1-CLCA2/CLCA2-RUNX1*, *RUNX1-TRPS1/TRPS1-RUNX1* et *RUNX1-SV2B*) est présentée (Table 2.5).

Translocation	Amorce	Gène	Position	Séquence (5'→3')
t(7;21)	RUNX1_ex1F	<i>RUNX1</i>	exon 1	ACAGAACCACAAGTTGGGTAGCCT
(p22;q22)/	RUNX1_ex4F	<i>RUNX1</i>	exon 4	GAGCTGAGAAATGCTACCGCAG
<i>RUNX1-USP42</i>	RUNX1_ex4,5F	<i>RUNX1</i>	exon 4-5	TGTCGGTCGAAGTGAAGAGG
<i>et USP42-</i>	RUNX1_ex7F	<i>RUNX1</i>	exon 7	CCATTGCCTCTCCTTCTGTGC
<i>RUNX1</i>	RUNX1_ex6R	<i>RUNX1</i>	exon 6	AGGGTTAAAGGCAGTGGAGTGGTT
	RUNX1_ex7R	<i>RUNX1</i>	exon 7	AGGCAATGGATCCCAGGTATTGGT
	RUNX1_ex7R2	<i>RUNX1</i>	exon 7	GTGAAATGGGCGTTGTGGGT
	RUNX1_ex8R	<i>RUNX1</i>	exon 8	ACCATGGAGAACTGGTAGGAGC
	USP42_ex2F	<i>USP42</i>	exon 2	AGACATGGATGCAGGTTCTGCC
	USP42_ex2F1	<i>USP42</i>	exon 2	CTGAATCTTCAGACCCATCAGCCT
	USP42_ex2F2	<i>USP42</i>	exon 2	AAAGGATCAAGCCCTAGGTGA
	USP42_ex5F	<i>USP42</i>	exon 5	TGCTTGAATGGCAGCAATAA
	USP42_ex15F	<i>USP42</i>	exon 15	AAATCGGCAGCCTCAGAAAGGT
	USP42_ex3R	<i>USP42</i>	exon 3	TATTGCCCAAATTCTGGAGCCCA
	USP42_ex3R1	<i>USP42</i>	exon 3	TGTTGCCACTTAAGACAAATCTTC
	USP42_ex4R	<i>USP42</i>	exon 4	ACGTCCCCAGGATTACTGAGTGCC
	USP42_ex6R	<i>USP42</i>	exon 6	GGTATCCTCCAAATATCTGACAAAC
	USP42_ex14R	<i>USP42</i>	exon 14	CGTCGAGCCTTTTCAGTTTGTGCT
	USP42_ex15R	<i>USP42</i>	exon 15	TACAAGTGCAGTTCTGTGCTGGGA
	ACTB_ex3F	<i>ACTB</i>	exon 3	ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA
	ACTB_ex4R	<i>ACTB</i>	exon 4	TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA
t(1;21)	RUNX1_ex1F	<i>RUNX1</i>	exon 1	ACAGAACCACAAGTTGGGTAGCCT
(p22;q22)/	RUNX1_ex2F	<i>RUNX1</i>	exon 2-3	AATCCTTCTAGAGACGTCCACGATGC
<i>RUNX1-CLCA2</i>	RUNX1_ex4,5F	<i>RUNX1</i>	exon 4-5	TGTCGGTCGAAGTGAAGAGG
	RUNX1_ex6F	<i>RUNX1</i>	exon 6	CCTCCCTGAACCACTCCACT
	RUNX1_ex7R	<i>RUNX1</i>	exon 7	AGGCAATGGATCCCAGGTATTGGT
	RUNX1_ex8R	<i>RUNX1</i>	exon 8	ACCATGGAGAACTGGTAGGAGC
	CLCA2_ex2R	<i>CLCA2</i>	exon 2	TAGCTTTCCATGTGGCAGGT
	CLCA2_ex4R	<i>CLCA2</i>	exon 4	TGGGCCCATTCATGGACAAACACT
	CLCA2_ex5R	<i>CLCA2</i>	exon 5	GGGTGCTATTGTAGATAAAGGTGC
	CLCA2_ex7R	<i>CLCA2</i>	exon 7	TTTGGTGTAGCTGGGCTCTGATCT
	CLCA2_ex10R	<i>CLCA2</i>	exon 10	CATAGTGTCGTTGCCACAG
	CLCA2_ex1F	<i>CLCA2</i>	exon 1	AGTTTGTGACTCTCCTGGTTGCCT
	CLCA2_ex8F	<i>CLCA2</i>	exon 8	TTCTTGCAATTGCTTACCC
t(8;21)	RUNX1_ex4,5F	<i>RUNX1</i>	exon 4-5	TGTCGGTCGAAGTGAAGAGG
(q23.3;q22)/	RUNX1_ex8R	<i>RUNX1</i>	exon 8	ACCATGGAGAACTGGTAGGAGC
<i>RUNX1-TRPS1</i>	TRPS1_ex3R	<i>TRPS1</i>	exon 3	TGTCTGTACCTCATCATGCGGAA
<i>et TRPS1-</i>	TRPS1_ex4R	<i>TRPS1</i>	exon 4	TGACATCCGATGCTTGGGACTCAT
<i>RUNX1</i>	TRPS1_ex1F	<i>TRPS1</i>	exon 1	TGCCGAGGGTGTCTTGACGATTA
t(15;21)	RUNX1_ex1aF	<i>RUNX1</i>	exon 1a	ACAGAACCACAAGTTGGGTAGCCT
(q26.1;q22)/	RUNX1_ex1bF	<i>RUNX1</i>	exon 1b	TCATTTCCCTTCGTACCCACAGTGC
<i>RUNX1-SV2B</i>	RUNX1_ex1bF2	<i>RUNX1</i>	exon 1b	TTCCTTCGTACCCACAGTGCTTCA
	SV2B_int1AS	<i>SV2B</i>	intron 1 AS	AGGGCCTCTTCTTTCTGTACCA
	SV2B_int1AS1	<i>SV2B</i>	intron 1 AS	ACATCTTATCCTGCTGCCTCTGGT
	SV2B_int1AS2	<i>SV2B</i>	intron 1 AS	TGGCTTTGGAGCTGAGGGACAATA
	SV2B_int1AS3	<i>SV2B</i>	intron 1 AS	ATCCTTGTACGCCTGTAATCCCA

Table 2.5. Séquences des oligonucléotides ayant servi à l'étude, à l'amplification et au clonage des gènes de fusion *RUNX1-USP42/USP42-RUNX1*, *RUNX1-CLCA2/CLCA2-RUNX1*, *RUNX1-TRPS1/TRPS1-RUNX1* et *RUNX1-SV2B*.

2.4.3 Technique de RACE PCR selon Invitrogen

La technique de 3'RACE PCR exploite la queue poly(A) exprimée par tous les ARNm. À l'aide d'une amorce spécifique à cette composante, il devient possible de déterminer la région 3' d'un ARNm dont la séquence est partiellement inconnue. Le protocole fourni avec la trousse « 3'RACE System For Rapid Amplification of cDNA Ends » de Invitrogen (Invitrogen ; no. cat. 18373-019) a été respecté.

Brièvement, un mélange d'ARN (1-2 µg), d'amorces 10 µM « SuperScript™ II Reverse Transcriptase adapter primer » (1 µL) et d'eau a été dénaturé par un chauffage à 70°C pendant 10 minutes. Un mélange de 2 µL de tampon PCR 10X, de 2 µL de MgCl₂ 25mM, de 1 µL de dNTP 10mM et de 2 µL de DTT 0,1M a été ajouté à l'ARN puis a été soumis à 42°C pendant 5 minutes. L'enzyme « SuperScript™ II RT » (1µL) a été ajouté au mélange contenant l'ARN et les amorces AP « adapter primer ». La réaction de synthèse de l'ADNc a été réalisée à 42°C pendant 50 minutes puis à 70°C pendant 15 minutes. L'enzyme « RNase H » a été ajoutée à la réaction, laquelle a été incubée à 37°C pendant 20 minutes. Des PCR ont ensuite été réalisées à l'aide de l'ensemble « Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity » de Invitrogen, d'amorces « Universal Amplification Primers » 10 µM et d'amorces spécifiques à l'extrémité 5' de *RUNX1*

(Table 2.6). Les conditions d'amplification suivantes ont été utilisées : dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes suivi de 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes et d'extension à 68°C pendant 3 minutes. Une extension finale à 68°C de 7 minutes a aussi été réalisée.

La technique de 5'RACE PCR de Invitrogen (Invitrogen ; no. cat. 18374-058) a également été utilisée afin d'étudier la fusion réciproque générée lors de la t(15;21)(q26.1;q22). Contrairement à la 3'RACE laquelle exploite la queue poly(A), la 5'RACE exploite la coiffe 7-méthylguanine des ARNm. Des amorces spécifiques à l'extrémité 3' de *RUNX1* (Table 2.6), des amorces « Universal Amplification Primers » 10 µM et l'ensemble de PCR « Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity » de Invitrogen ont été utilisées afin d'étudier les possibles fusions de la t(15;21)(q26.1;q22). Les conditions d'amplification suivantes ont été respectées : 2 minutes de dénaturation initiale à 94°C suivi de 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant une minute, d'hybridation à 55°C pendant une minute et d'extension à 68°C pendant 2 minutes.

PCR	Amorce	Gène	Exon/intron	Séquence (5'→3')
3'RACE	RUNX1_ex1aF	<i>RUNX1</i>	exon 1a	5'GCTGAAACAGTGACCTGTCTTGGT
	RUNX1_ex1bF	<i>RUNX1</i>	exon 1b	5'TCATTTCCTTCGTACCCACAGTGC
	RUNX1_ex1bF2	<i>RUNX1</i>	exon 1b	5'TTCCTTCGTACCCACAGTGCTTCA
5'RACE	RUNX1_2,3R	<i>RUNX1</i>	exon 2-3	5'GCATCGTGGACGTCTCTAGAAGGATT
	RUNX1_4R	<i>RUNX1</i>	exon 4	5'TCCCACTTCGACCGACAAACCTGA

Table 2.6. Séquences des oligonucléotides ayant servi à l'étude et/ou à l'amplification des transcrits de fusion *RUNX1-SV2B*.

2.5 Extraction, clonage de l'ADNc et séquençage

2.5.1. Extraction de l'ADNc d'un gel d'agarose

Avant le séquençage, les produits de PCR ont d'abord été extraits du gel d'agarose à l'aide de la trousse d'extraction « QIAEX II Gel Extraction Kit » (Qiagen ; no. cat. 20021), selon le protocole fourni par la compagnie. Cette méthode exploite le principe que des particules de gel de silice puissent lier l'ADN libéré lors de la dissolution du gel d'agarose, en présence d'un tampon à forte teneur en sels. La forte teneur en sels du tampon QX1 produit une rupture des liaisons hydrogènes établies entre l'ADN et l'agarose, libérant ainsi l'ADN en solution. L'ADN est retenu par les particules de silice et est ensuite élué par un contact des billes avec de l'eau ayant une faible teneur en sels.

Brièvement, aux bandes d'ADN d'intérêt, nous avons ajouté un volume de tampon QX1 calculé en fonction du poids des bandes d'agarose (ex : 300 μ L de QX1 pour 0,1 g d'ADN). À ce mélange, nous avons ajouté 10 μ L de particules de gel de silice QIAEX II en suspension (≤ 2 μ g d'ADN), puis avons chauffé ce mélange à 50°C pendant 10 minutes. Les billes ont été récupérées par centrifugation, ont été lavées avec 500 μ L de tampon QX1 et ont été lavées à deux reprises avec 500 μ L de tampon PE contenant de l'éthanol. L'éluion de l'ADN des billes de silice a été permise par l'addition d'environ 15 à 20 μ L d'eau déionisée et ultrafiltrée (pH 7.0 à 8.5).

2.5.2 Clonage des produits PCR (vecteur pGEM-T Easy)

Au cours de ce projet, nous avons eu recours à la technique de clonage afin de confirmer la nature de certains produits d'amplification de la fusion *RUNX1-USP42* obtenus par RT-PCR à l'aide des amorces RUNX1_4,5exF et USP42_ex3R (voir section 3.3.1). Chaque produit d'amplification a été inséré, par ligation, à l'intérieur d'un vecteur pGEM-T Easy (Fisher Scientific ; no. cat. A1380) suite à l'ajout des réactifs suivants : 5 µL de tampon de ligation 2X de la ligase T4, 1 µL (50 ng) du vecteur pGEM-T Easy, une quantité variable de produit PCR dit insert (ou 2 µL d'ADN contrôle 4 ng/µL), 1 µL d'ADN ligase T4 (3 unités/µL) et un volume ajusté d'eau pour atteindre un volume final de 10 µL. La quantité d'insert à mettre dans la réaction de ligation (en ng) a été définie en fonction de la concentration de l'insert, de la taille de l'insert (en kb) et du ratio insert/vecteur sélectionné (3:1). Les valeurs constantes suivantes ont été utilisées : 50 ng (quantité de vecteur) et 3,015 kb (taille du vecteur). Afin d'optimiser les ligations, une série de réactions a été incubée à la température pièce pendant une heure et une autre série a été incubée à 4°C pendant toute une nuit.

Voici un exemple de calcul :

$$\frac{50 \text{ ng (quantité de vecteur)} \times 0,4 \text{ kb (taille de l'insert)}}{3,015 \text{ kb (taille du vecteur)}} \times \frac{3}{1} \text{ (ratio)} = 19,9 \text{ ng d'insert}$$

Transformation des bactéries compétentes, sélection et extraction des vecteurs

Les vecteurs exprimant l'insert ont ensuite été insérés dans des bactéries compétentes JM109 (Fisher Scientific ; no. cat. A1380). Deux µL de chaque réaction de ligation ont été mélangés aux bactéries puis celles-ci ont été incubées sur glace pendant 20 minutes.

Le choc thermique a été réalisé à 42°C pendant 45 secondes puis sur glace pendant 2 minutes. Les bactéries transformées ont été cultivées à 37°C dans 950 µL de milieu nutritif SOC (Sigma-Aldrich ; S-1797) pendant 90 minutes. Les bactéries transformées ont été striées sur des pétris préalablement conditionné à l'ampicilline (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich ; A2804-50MG), contenant 50 µL d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG à 100 mM) (Sigma-Aldrich ; I-1284) et 50 µL de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside à 50 mg/mL) (Sigma-Aldrich ; B4252-50MG). Les pétris ont été incubés à 37°C pendant 16 à 24 heures puis les colonies blanches ont été sélectionnées. En effet, le IPTG induit la transcription de la β-galactosidase encodée par la séquence LacZ du vecteur. Le X-gal est un substrat de la β-galactosidase qui forme un composé bleu. Ainsi, lorsque la bactérie intègre un vecteur seul, elle exprime la β-galactosidase et hydrolyse le X-gal. Cependant, le vecteur est construit afin que les séquences d'intérêt s'insèrent dans la séquence LacZ, empêchant l'expression de la β-galactosidase et ainsi l'hydrolyse du X-gal. Les colonies ont ensuite été cultivées à 37°C dans 2 mL de milieu LB conditionné avec 20 µL d'ampicilline 10 mg/mL pendant toute une nuit. Les vecteurs ont été extraits selon le protocole accompagnant la trousse « QIAprep Spin Miniprep Kit » (Qiagen ; no. cat. 27104).

Digestion des vecteurs et isolation de l'ADN d'intérêt

L'insert a été extrait du vecteur en tirant profit des sites de restriction de l'enzyme EcoRI, présents de part et d'autre du site d'insertion dans le vecteur pGEM-T. La digestion a été réalisée dans un volume total de 20 µL, en utilisant 5 µL du vecteur

extrait, 2 μL de tampon EcoRI, 0,5 μL d'enzyme EcoRI (New England Biolabs ; no. cat. R01015) et 12,5 μL d'eau. La digestion a été réalisée pendant une heure à 37°C.

2.5.3 Méthode Sanger de séquençage

Suivant la purification des produits PCR, le séquençage a été effectué à la plate-forme de génomique de l'Institut de recherche en immunologie et oncologie (IRIC) de Montréal, à l'aide de la méthode par « terminaison de chaîne » de Sanger et d'un séquenceur 3730 de Applied Biosystems. Brièvement, l'ADN a été mélangé à une amorce spécifique (5 μM), à du tampon de séquençage, à une solution de séquençage « BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » laquelle contient des dNTPs, aux quatre didésoxyribonucléotides marqués d'un fluorochrome différent et à une ADN polymérase. La réaction a été placée sur un thermocycleur « Veriti 96 Well Fast Thermal Cycler » pendant deux heures et demie suivant un cycle d'activation d'une minute à 96°C et 25 cycles de dénaturation de 10 secondes à 96°C, d'hybridation de 5 secondes à 50°C et d'élongation d'une minute et 15 secondes à 60°C. Les produits ont ensuite été purifiés à l'éthanol, précipités par l'addition d'acétate de sodium 0,1M et lavés par l'ajout d'éthanol 95 % et d'éthanol 70 %. Le précipité a été suspendu dans une solution d'injection, a été chargé dans les capillaires du séquenceur et a été soumis à l'électrophorèse afin de permettre l'émission de la fluorescence de chaque brin produit. La fluorescence a finalement été captée à partir du bas du gel puis a été décodée,

permettant l'établissement d'un chromatogramme associé à la séquence du produit initial.

2.6 PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

La PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) est une méthode qui permet la quantification d'un produit, de façon directement proportionnelle à sa quantité de départ. La qRT-PCR est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent qui est interprété par un système informatique. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction. Au cours de ce projet, nous avons utilisé des sondes TaqMan afin de détecter l'amplification spécifique de chacune des cibles étudiées.

Sondes TaqMan® et validation des essais

La sonde Taqman® est un fragment d'ADN monobrin spécifique à une séquence cible, couplé en 5' à un fluorochrome émetteur dit « reporter » et en 3' à un fluorochrome suppresseur dit « quencher ». Lorsque le « reporter » et le « quencher » sont à proximité sur une sonde non dégradée, le « quencher » empêche l'émission de la fluorescence par le « reporter » par absorption de l'énergie émise par ce dernier, exploitant le principe FRET « Fluorescence Resonance Energy Transfert ». Lorsqu'il y a appariement de la sonde avec sa séquence complémentaire, la *Taq* polymérase dégrade la sonde via son activité exonucléase, ce qui permet le relâchement du « reporter » et l'émission de sa

fluorescence. Pour chaque essai Taqman utilisé (amorce sens, amorce anti-sens et sonde Taqman), une courbe standard a été réalisée. La courbe a servi à vérifier que l'efficacité de la réaction était près de 100 %, à l'aide de duplicata de quatre dilutions en série d'un ADNc universel ou d'un ADNc spécifique à l'étude dont on connaissait la concentration. En fonction de la quantité de départ et du Ct « cycle threshold » de chaque dilution, une pente a été obtenue, permettant de calculer l'efficacité de chaque essai ($E = [10^{(-1/\text{pente})}] - 1$).

La qRT-PCR

Les réactions d'amplification ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de l'IRIC, pour chacun de nos projets de qRT-PCR. Brièvement, 5 μL de « 2X Taqman Fast qPCR MasterMix » de ABI, 0,05 μL du mélange d'amorces à 50 μM , 1 μL de la sonde « Universal probe library » (UPL) 1 μM et 2,5 μL d'eau ont été ajoutés à 1,5 μL d'ADNc afin d'obtenir une réaction finale de 10 μL . Les réactions ont été réalisées sur un système 7900 HT Fast system (Applied Biosystems), selon le cycle d'amplification suivant : 3 minutes d'activation initiale à 95°C et 40 cycles de dénaturation (5 secondes à 95°C) et d'hybridation/élongation (30 secondes à 60°C). Se référer à la table 2.7 pour les détails relatifs à chaque étude qRT-PCR réalisée.

Gène	Essai	UPL	E	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')	Contrôle	Calibrateur	Nb	Thèse
<i>USP42</i>	IR0327	49	101%	tgcttgaatggcagcaataa	ggtatcctccaaatatctgacaaac	<i>GAPDH</i> *	05H028*	81	3.6.2
<i>GAPDH</i>	Hs00266705					<i>18S</i>	05H159		
<i>18S</i>	Hs03003631								
<i>USP42</i>	IR0327	49	101%	tgcttgaatggcagcaataa	ggtatcctccaaatatctgacaaac	<i>GAPDH</i> *	07H088	31	3.6.2.
						<i>18S</i>	07H139		
							07H140*		
<i>USP42</i>	IR0327	49	101%	tgcttgaatggcagcaataa	ggtatcctccaaatatctgacaaac	<i>GAPDH</i>	07H088*	7	3.6.3
<i>USP42</i>	IR2167	25	89%	aaaggatcaagccctaggatga	tgttgccacttaagacaaatcttc	<i>TBP</i>	07H139*		
<i>TBP</i>	Hs00427620					<i>HPRT</i> *	09H007*		
<i>HPRT</i>	Hs02800695								
<i>USP42</i>	IR0327	49	101%	tgcttgaatggcagcaataa	ggtatcctccaaatatctgacaaac	<i>HPRT</i> *	07H088*	50	3.6.2.
<i>USP6</i>	IR2023.2	88	82%	atcgatatggagccaagca	cgggttatactccgaataggc	<i>TBP</i>	07H139*		
							07H140*		
							09H007*		
<i>USP42</i>	IR3027	49	101%	tgcttgaatggcagcaataa	ggtatcctccaaatatctgacaaac	<i>HPRT</i> *	07H088*	48	3.6.2
<i>USP6</i>	IR2028	40	93%	gctcctcctgttcttactcttca	tgtgtttgtaactttgcgtagg	<i>TBP</i>	07H139*		
<i>USP10</i>	IR2667	38	91%	gtatgtgcggcgagaag	gccctgttagttgaagatgaca		07H140*		
<i>USP10</i>	IR2668	62	99%	aacgcacagcctactctct	cacacacagcgcacacag		09H007*		
<i>CEBPA</i>	IR1443	28	95%	ggagctgagatcccagca	ttctaaggacagcgtggag	<i>HPRT</i> *	07H088*	44	7.2
<i>CRT</i>	IR2845.2	81	93%	acatgcacggagactcagaa	gccctgttagttgaagatgaca	<i>TBP</i>	07H139*		
<i>JUP</i>	IR2846.2	58	93%	caatgagccctatggagatga	gccgtcgcgttaggtgtc		07H140*		
<i>MYC</i>	IR2847	77	93%	tgctccatgaggagacacc	ctttccacagaacaacatcg				
<i>CEBPA</i>	IR1443	28	95%	ggagctgagatcccagca	ttctaaggacagcgtggag	<i>HPRT</i> *	07H088*	46	7.2
<i>CRT</i>	IR2845.2	81	101%	acatgcacggagactcagaa	gccctgttagttgaagatgaca	<i>TBP</i>	07H140*		
<i>JUP</i>	IR2846.2	58	108%	caatgagccctatggagatga	gccgtcgcgttaggtgtc		09H007*		
<i>MYC</i>	IR2847	77	103%	tgctccatgaggagacacc	ctttccacagaacaacatcg				
<i>CTNNB1</i>	IR2834	37	101%	tggccatctttaagtctggag	caacacagaatccactgtgga				
<i>CCND1</i>	IR2835.2	67	105%	gaagatcgtccacactg	gacctcctctgcacttct				
<i>TRPS1</i>	IR3039	1	94%	tgaagtcaatgctgggtatga	ccagataccttcttctgtacct	<i>HPRT</i> *	07H088*	7	5.5
<i>TRPS1</i>	IR3040.3	65	101%	cgtgtggcctctaccagaag	gggttaaggccttctctg	<i>TBP</i>	07H140*		
							09H007*		
<i>SLCO3A1</i>	IR3045	69	92%	gtctcctacatcgacgaccac	aataccagcatcgtgaacagg	<i>HPRT</i> *	07H088*	8	6.7
<i>RUNX1c</i>	IR3041	40	93%	agcctggcagtgctcagaagt	gggactcaatgattctttacca	<i>TBP</i>	07H140*		
<i>RUNX1b</i>	IR3042	46	105%	tcggctgagctgagaaatg	gtgatgtcagagtgaaagcttt		09H007*		
<i>RUNX1b</i>	IR3252	69	108%	ccttcagaagagggtgcatt	tggacgtctctagaaggattcat				

Table 2.7. Gènes étudiés par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) à l'aide de divers essais Taqman. Pour chaque essai, la sonde UPL, l'efficacité (E) et les amorces sont indiquées. Les contrôles et les spécimens de moelle normale utilisés de même que le nombre total de patients évalués pour chaque étude sont notés. Le contrôle endogène et le calibrateur des analyses finales sont indiqués par des astérisques. Une référence à la section résultat de la thèse est indiquée pour chaque étude qRT-PCR réalisée.

La méthode d'analyse relative par $2^{-\Delta\Delta Ct}$

À l'aide de la méthode d'analyse par quantification relative, l'expression d'un gène d'intérêt a été normalisée par rapport à l'expression d'un gène contrôle, lequel possède généralement une expression ubiquitaire/constante et un profil d'expression connu et similaire au gène étudié. Les gènes glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*), de la sous-unité 18S de l'ARN (*18S*), « TATA box binding protein » (*TBP*), hypoxanthine phosphoribosyltransférase (*HPRT*) et bêta-actine (*ACTB*) ont été utilisés en guise de contrôles endogènes dans nos études.

Dans un premier temps, le Ct du gène d'intérêt a été comparé au Ct du contrôle endogène [$Ct_{\text{gène intérêt}} - Ct_{\text{contrôle endogène}} = \Delta Ct$]. Dans un second temps, cette valeur ΔCt a été rapportée à l'expression d'un échantillon calibrateur qui a servi de référence et auquel a été comparé tous les autres échantillons de notre analyse [$\Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{calibrateur}} = \Delta\Delta Ct$]. Les valeurs de quantification relative (RQ) ont été calculées selon la formule $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Pour les études de qRT-PCR, nous avons utilisé des spécimens de moelles osseuses normales comme calibrateur, que ce soit un seul échantillon ou une moyenne de 3 à 4 échantillons normaux. Des valeurs de RQ supérieures à 5 ont été considérées comme des surexpressions et des valeurs de RQ inférieures à 0,5 comme des sous-expressions. Les listes des ADNc utilisés au cours des neuf projets de qRT-PCR décrits dans ce manuscrit sont fournies en annexe (Tables 9.1 à 9.9).

2.7 Analyse protéique

Au cours de ce projet, des analyses d'immunofluorescence et de western blot ont été réalisées sur certains échantillons de patients leucémiques. Les techniques réalisées sont brièvement décrites.

2.7.1 Cytospin

Pour les études d'immunofluorescence, des cytopspins de cellules leucémiques ont été réalisés sur un appareil « Shandon Cytospin 3 » à l'aide d'un mélange de 200 μ L de suspension cellulaire fraîche (1×10^6 cellules/mL de RPMI complet) et de 800 μ L de solution saline de chlorure de sodium 0,9 % (Baxter ; no. cat. JF7634). Trois cents μ L du mélange cellulaire/solution saline ont été soumis à une centrifugation de 8 minutes à 600 rpm. Les lames ont été séchées à l'air libre puis ont été fixées à la paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich ; no. cat. P6148-500G).

2.7.2 Fixation et immunofluorescence

Les lames de cytopspin ont d'abord été lavées avec une solution de PBS 1X préalablement à la fixation puis ont été incubées pendant 20 minutes avec 1 mL de paraformaldéhyde 1 % ou 3 %, selon le type cellulaire. La paraformaldéhyde 3 % a été utilisée pour les lignées cellulaires tandis qu'une fixation à la paraformaldéhyde 1 % a été utilisée pour les cellules primaires. Une perméabilisation des membranes a été réalisée

avec 2 mL de tampon de perméabilisation (NP-40 0,5 %, PBS 1X et azide de sodium 1 mM) pendant 30 minutes. Les lames ont ensuite été lavées avec 2 mL de tampon de lavage (NP-40 0,1 %, PBS 1X et azide de sodium 1 mM) et incubées pendant 1 heure avec 2 mL de solution de blocage contenant 10 % de SVF, préalablement à l'immunofluorescence.

À chaque lame, nous avons ajouté 50 µL de l'anticorps primaire RUNX1 (Cell signaling 4334 ; 1/500) préparé dans la solution de blocage. L'anticorps a été incubé pendant 3 heures à température pièce, dans une chambre humide. La lame a ensuite été lavée dans un bain de tampon de lavage, à trois reprises pendant 15 minutes. L'anticorps secondaire GAR-Cy3 (50 µL ; 1/800) (Jackson immunoresearch, no. cat. 111-165-144), préparé dans la solution de blocage, a été appliqué simultanément avec 5 µL de DAPI puis a été incubé pendant une heure dans une chambre humide à température pièce. Chaque lame a été lavée dans un bain de tampon de lavage, à trois reprises pendant 15 minutes, et a été lavée une fois, dans un bain de PBS 1X et dans un bain d'eau. L'agent « Anti-fade mounting media VectaShield » a finalement été appliqué sur la région d'intérêt afin de préserver la fluorescence.

2.7.3 Extraction de protéines

Les protéines utilisées au cours de ce projet ont été extraites à partir des cellules mononuclées isolées de moelle osseuse ou de sang périphérique de patients leucémiques

ou de lignées cellulaires. Aux cellules fraîchement décongelées, nous avons ajouté une quantité variable de tampon de lyse cellulaire complet, estimée en fonction de la taille du culot [Tris 1M, EDTA 500mM (EMD Chemicals ; no. cat. 4010), NP-40 10 %, KCL 3M, α -protéase 1X (Roche Applied Sciences ; no. cat. 11836170001), DTT 1mM (Sigma-Aldrich ; no. cat. 43816-10ML), PMSF 1mM (MP Biomedicals ; no. cat. 02195381-25GM)]. La lyse des composantes cellulaires a été réalisée par homogénéisation complète de l'échantillon dans la solution de lyse. Dans certains cas où l'homogénéisation était incomplète, la lyse a été complétée par une sonication à froid. Les protéines ont été dosées à l'aide de la méthode de Bradford (Bio-Rad ; no. cat. 500-0006). Aux protéines totales, nous avons ajouté un volume équivalent de tampon de charge contenant 5 % de 2-mercaptoéthanol (Bio-rad; no. cat. 161-07-10). Les lignées cellulaires et les spécimens de leucémies primaires utilisés pour les études protéiques sont répertoriés dans les tables 2.8 et 2.9.

BCLQ	FAB	Provenance	Principale anomalie répertoriée
Kasumi-1	M2	ATCC	t(8:21)(q22;q22)/ <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
REH	LAL-B	DMSZ	t(4;12;21;16)(q32;p13;q22;q24.3)/ <i>ETV6-RUNX1</i>
OCI-AML3	M4	DMSZ	mutations de <i>NPM1</i> et de <i>DNMT3A</i>
MONO-MAC1	M5	DMSZ	t(9;11)(p22;q23)/ <i>MLL-MLLT3</i>
KOPN-8	LAL-B	DMSZ	t(11;19)(q23;p13)/ <i>MLL-ENL</i>
HL-60	LPA	ATCC	non spécifié
K562	LMC-PB	ATCC	non spécifié
KG-1	LAM	ATCC	non spécifié

Table 2.8. Lignées de cancers hématologiques. Le diagnostic morphologique, la provenance (ATCC : www.atcc.org ou DMSZ : www.dmsz.de) et l'anomalie cytogénétique principale de la lignée sont notés tel que rapportés dans le site web du fournisseur. M2, leucémie myéloïde aiguë (LAM) avec maturation ; LAL-B, leucémie

aiguë lymphoblastique B ; M5, leucémie monoblastique/monocytaire aiguë ; LPA, leucémie promyélocytaire aiguë ; LMC-PB, leucémie myéloïde chronique en phase blastique. Se référer à la section 7.2 pour les résultats.

BCLQ	Dx	% blastes	Spécimen	Caryotype
03H083	M2	85	sang	46,XY,t(8;21)(q22;q22),inv(9)(p11q12)c[20]
03H109	M4Eo	92	moelle	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
07H099	M1	82	sang	46,XX,inv(16)(p13q22)[20]
04H120	M1	90	moelle	46,XY,del(5)(q22q33),t(7;21)(p22;q22)[20]

Table 2.9. Caractéristiques morphologiques et caryotypes des quatre spécimens de leucémies primaires utilisés pour les études protéiques. Dx diagnostic morphologique ; M2, leucémie myéloïde aiguë (LAM) avec maturation ; M4Eo, leucémie aiguë myéloblastique avec éosinophiles anormaux ; M1, LAM sans maturation. Se référer à la section 7.1 pour les résultats.

2.7.4 Western blot

Les protéines extraites ont été chargées dans des gels de polyacrylamide contenant du SDS, ont été soumises à une électrophorèse et ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (Bio-rad ; no. cat. 162-0112). L'anticorps primaire a été appliqué sur la membrane, laquelle a été incubée à 4°C pendant une nuit. Les interactions non-spécifiques ont été lavées à deux reprises pendant 15 minutes, à l'aide d'une solution de PBS/lait/Tween 20 puis à quatre reprises pendant 15 minutes dans une solution de PBS/Tween 20. L'anticorps secondaire couplé à la « horseradish peroxidase » (HRP) (Jackson immunoresearch : 111-035-144 et 115-035-062) a ensuite été appliqué sur la membrane puis cette dernière a été incubée pendant 45 minutes à température pièce. Le

second anticorps a été lavé à deux reprises pendant 15 minutes dans la solution de PBS/Lait/Tween 20 et à deux reprises pendant 15 minutes dans la solution de PBS/Tween 20. Un lavage final de 15 minutes a été réalisé dans du tampon PBS 1X avant la révélation des bandes par la chimie « Immuno-Star HRP Chemiluminescent » (Bio-rad ; no. cat. 170-5041). Un appareil de détection Fujifilm LAS-3000 muni d'une caméra CCD LAS-4000 a servi à la révélation.

Avant d'étudier un nouvel anticorps, les membranes ont été incubées dans un four à 65°C, pendant 30 minutes, dans un tampon de « stripping » [TRIS à une concentration finale de 62,5 mM, SDS à une concentration finale de 2 %, β -mercaptoéthanol à une concentration finale 0,6 % et eau]. Les « strippings » nous ont permis d'incuber de façon séquentielle les différents anticorps sur les membranes complètes. Une liste complète des anticorps utilisés pour les études de western blot est fournie à la table 2.10.

Anticorps	Compagnie	Type	Région ciblée	Dilution	Anticorps sec.	Dilution Ac sec.	Utilisation
RUNX1	Cell signaling (4334)	Polyclonal de lapin	Peptide en amont du domaine RHD	1/500 (IF); 1/1 000 (WB)	GAR-Cy3; GAR-HRP	1/800; 1/2500	IF; WB
Tubuline	Sigma (T6199)	Monoclonal de souris	Acides aminés 426-430	1/5 000	GAM-HRP	1/5000	WB
SPI1	Santa Cruz (Sc-352)	Polyclonal de lapin	Peptide en position C-terminale	1/1 000	GAR-HRP	1/1000	WB
CEBPA	Abcam (Ab40761)	Monoclonal de lapin	Peptide en position N-terminale	1/10 000	GAR-HRP	1/5000	WB
CRT	Sigma (c4606)	Polyclonal de lapin	Acides aminés 401-417	1/50 000	GAR-HRP	1/5000	WB

Table 2.10. Anticorps utilisés pour les études d'immunofluorescence et de western blot. La provenance, la région reconnue et les dilutions utilisées pour chaque anticorps

primaire et secondaire sont notées. Ac, anticorps ; sec., secondaire ; GAR-Cy3, chèvre anti-lapin couplé au fluorochrome Cy3 ; GAR-HRP, GAR couplé à la HRP « horseradish peroxidase » ; GAM-HRP, chèvre anti-souris couplé à HRP ; IF, immunofluorescence; WB, Western blot.

CHAPITRE 3

3. Étude de la t(7;21)(p22;q22)

3.1 Paramètres cliniques du cas 04H120

En novembre 2004, nous avons reçu à la BCLQ les échantillons de moelle osseuse et de sang périphérique d'un sujet de sexe masculin âgé de 32 ans. Le patient présentait des antécédents de sarcoïdose pulmonaire, de dépression, de toxicomanie et de tabagisme actif. Le patient a été évalué initialement pour une douleur à l'os maxillaire inférieur apparue suite à une chirurgie pour un abcès dentaire. Une formule sanguine complète a démontré un décompte de leucocytes de $12,1 \times 10^9/L$ (valeur normale dans notre laboratoire : 4,5 à $10,8 \times 10^9/L$), une thrombopénie (décompte de plaquettes de $45 \times 10^9/L$; valeur normale : 140 à $440 \times 10^9/L$) et de l'anémie (hémoglobine à 93 g/L ; valeur normale pour l'homme : 134 à 172 g/L). L'examen du frottis sanguin a révélé la présence de cellules blastiques. L'examen morphologique et l'analyse immunophénotypique de l'aspiration de moelle osseuse ont montré une moelle hypercellulaire avec 90 % de blastes positifs pour les marqueurs HLA-DR, CD117, CD34, CD33 et CD13. Une expression aberrante des marqueurs CD7 et CD56 a aussi été notée. Un diagnostic de LAM *de novo* sans maturation a été établi selon les critères de classification du WHO (Swerdlow et al., 2008) (LAM M1 ; selon les critères de classification FAB). Le patient a débuté un traitement de chimiothérapie standard de type 7-3, composé de cytarabine et daunorubicine, lequel a été précocement interrompu

en raison d'une infection fongique sévère par *mucormycosis* résistante au traitement. La sévérité de l'infection a empêché l'administration subséquente d'autre chimiothérapie. Le patient a reçu des soins palliatifs et il est décédé en juillet 2005.

3.2 Analyse cytogénétique

L'analyse caryotypique a révélé une formule chromosomique masculine anormale à 46,XY,del(5)(q22q33),?del(21)(q22)[20] (Fig. 3.1A). Une délétion interstitielle du bras long du chromosome 5 ainsi qu'une délétion possible du bras long du chromosome 21 ont été détectées. Une investigation complémentaire par SKY a été effectuée, nous permettant de déceler une translocation semi-cryptique entre le bras long du chromosome 21 et le bras court du chromosome 7. La formule caryotypique a donc été révisée comme suit : 46,XY,del(5)(q22q33),t(7;21)(p?22;q22)[20] (Figs. 3.1A-3.1B). Une hybridation *in situ* sur des chromosomes métaphasiques, à l'aide de la sonde RUNX1-RUNX1T, a révélé la présence de deux signaux rouges (*RUNX1T1*) et de trois signaux verts (*RUNX1*) suggérant un réarrangement de *RUNX1* (Fig. 3.2B). Une hybridation complémentaire a été effectuée à l'aide de la sonde LSI EGR1 (5q31) Spectrum Orange/D5S23, D5S721 Spectrum Green et de la sonde LSI CSF1R (5q33-q34) Spectrum Orange/D5S23, D5S721 Spectrum green. Une délétion interstitielle des bandes 5q31 et 5q33 a respectivement été confirmée dans 92 % et 92,5 % des cellules analysées (Fig. 3.2C).

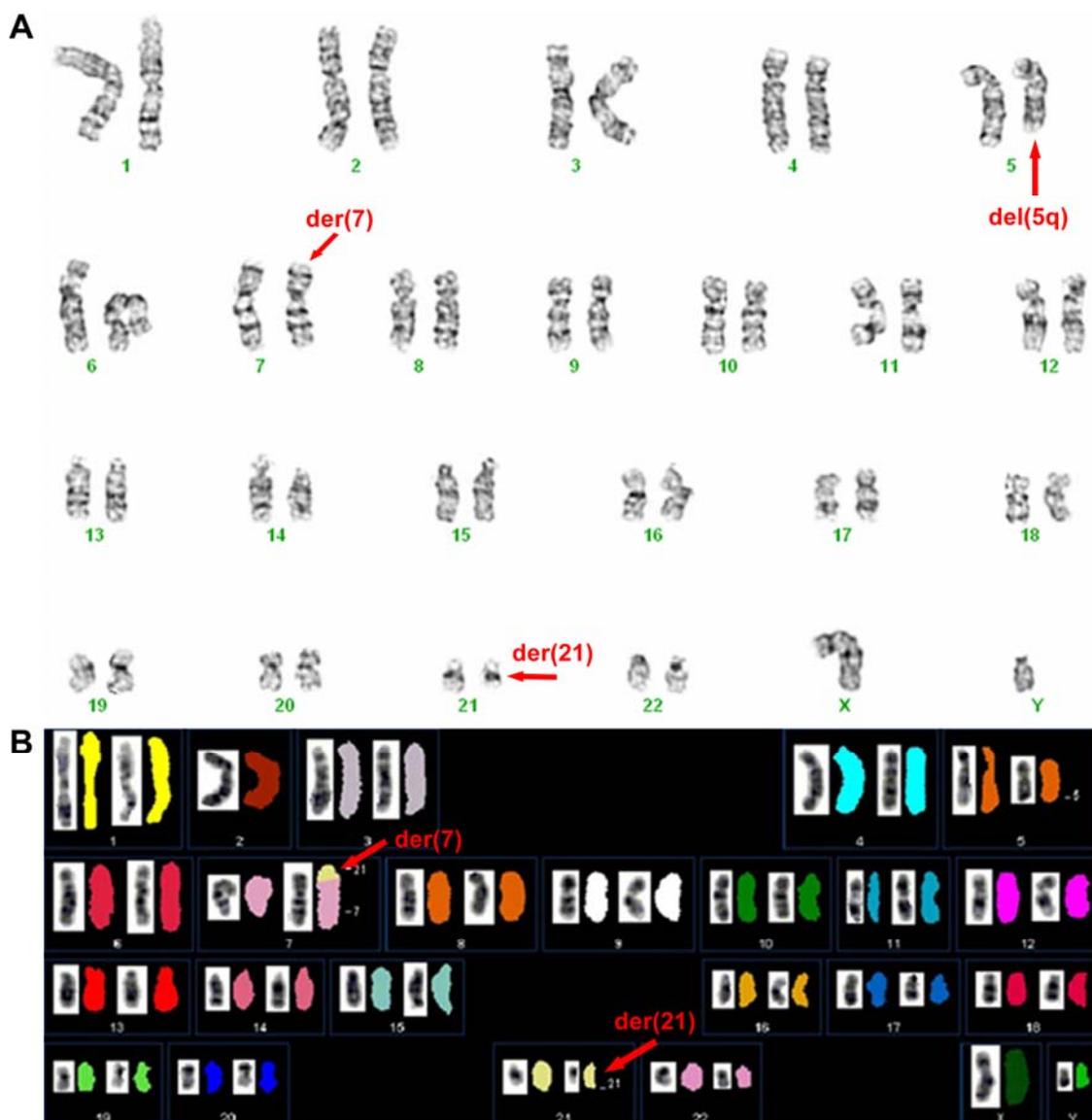


Figure 3.1. Analyse cytogénétique des cellules mononucléées de la moelle osseuse du patient atteint de leucémie aiguë myéloïde sans maturation présentant la $t(7;21)(p22;q22)$. (A) Caryotype en bandes G démontrant une délétion interstitielle au niveau du bras long du chromosome 5 [del(5q)] et une translocation semi-cryptique entre les chromosomes 7 et 21. Les flèches rouges indiquent les chromosomes dérivés 7 [der(7)] et dérivés 21 [der(21)] ainsi que la del(5q). (B) Caryotype spectral révélant la translocation semi-cryptique entre les chromosomes 7 et 21.

3.2.1 Identification du point de cassure sur le gène *RUNXI*

Afin de confirmer l'implication du gène *RUNXI* dans cette translocation, une étude de caractérisation a été entreprise à l'aide des sondes BAC RP11-299D9 (139 kb), couvrant l'intron 1b et les exons 2 à 8 de *RUNXI*, et RP11-771C10 (195 kb), couvrant l'intron 7a et les exons 7 et 8 du gène. Basé sur l'orientation de *RUNXI* (télomère vers centromère), il nous était possible de déduire que la partie 5' de *RUNXI* était transloquée sur le chromosome 7 tandis que la partie 3', représentant les exons centromériques, restait sur le chromosome dérivé 21 [der(21)] (Fig. 3.2A). Trois signaux respectivement localisés sur le chromosome 21 normal, sur le chromosome dérivé 7 [der(7)] et sur le der(21) ont été détectés avec la sonde RP11-299D9 (Fig. 3.2D), suggérant la présence d'une cassure localisée à l'intérieur de la région couverte par cette sonde. L'hybridation de la sonde RP11-771C10, localisée en position centromérique par rapport à la sonde RP11-299D9, a révélé la présence de deux signaux, respectivement localisés sur le chromosome 21 normal et sur le der(21). Cette analyse complémentaire nous a permis de confirmer une cassure en position télomérique et l'implication de *RUNXI* au sein de cette t(7;21)(p?22;q22) (Fig. 3.2E). Basé sur ces résultats d'hybridation, deux hypothèses ont été émises quant à la localisation du point de cassure sur le gène *RUNXI*. La cassure pouvait d'abord être située à l'intérieur du BCR de *RUNXI*, soit entre les exons 5 et 7, ou pouvait être localisée au niveau de l'exon 7, rendant le troisième signal généré par la sonde RP11-771C10 indétectable en raison de la limite de résolution de la technique de FISH.

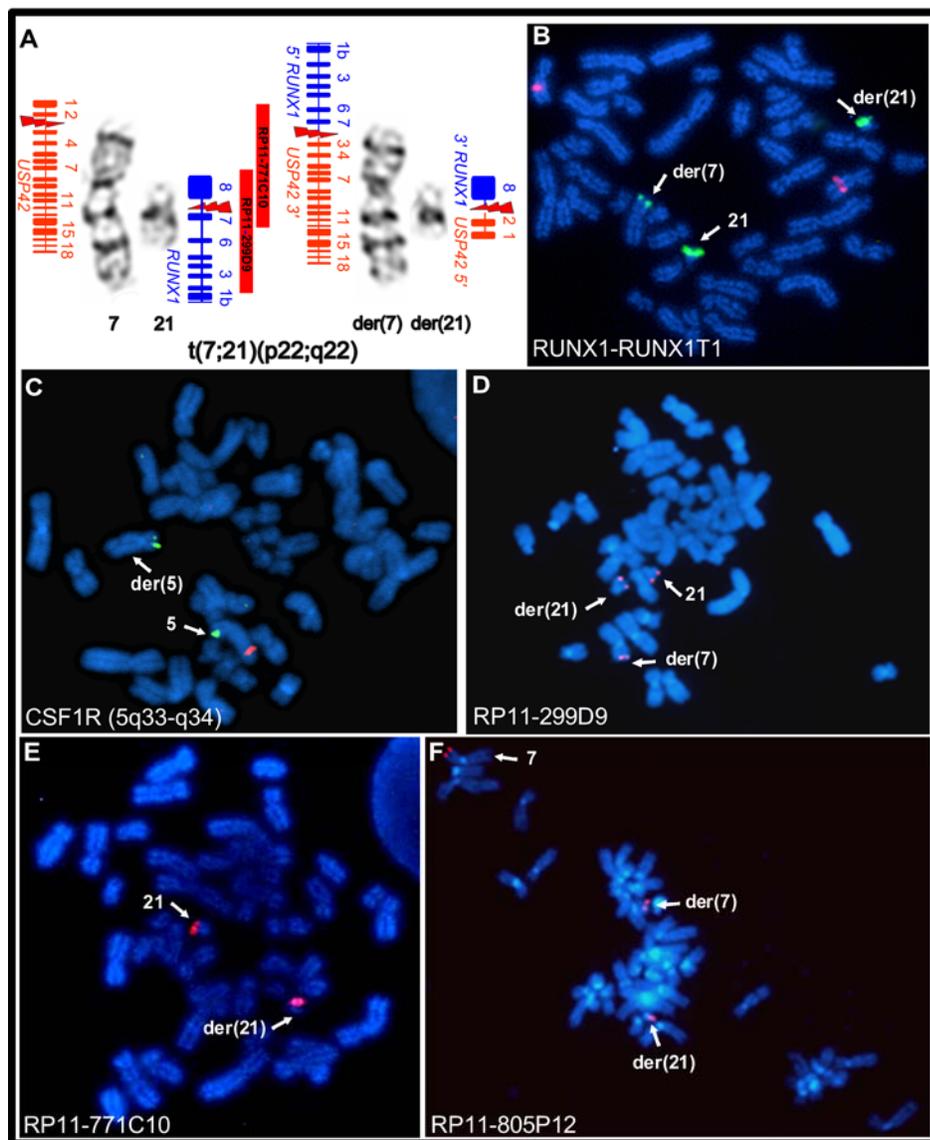


Figure 3.2. Analyse par hybridation *in situ* en fluorescence sur les chromosomes métaphasiques obtenus à partir des cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient présentant la $t(7;21)(p22;q22)$. (A) Représentation schématique des gènes *RUNX1* et *USP42* sur les chromosomes 7 et 21 normaux ainsi que des gènes de fusion *RUNX1-USP42* et *USP42-RUNX1* sur les chromosomes dérivé 7 [*der(7)*] et dérivé 21 [*der(21)*]. Le BAC RP11-299D9 couvre une portion de l'intron 1b et les exons 2 à 8 de *RUNX1* et le BAC RP11-771C10 couvre partiellement l'intron 7a, complètement les exons 7 à 8 et une région centromérique au gène *RUNX1*. (B) Hybridation de la sonde

RUNX1-RUNX1T1 montrant la présence de deux signaux rouges sur les deux chromosomes 8 normaux (*RUNX1T1* ; 8q22) et de trois signaux verts sur le chromosome 21 normal et sur les deux chromosomes der(7) et der(21) (*RUNX1* ; 21q22). Ce profil d'hybridation suggère la présence d'une cassure localisée à l'intérieur du locus de *RUNX1*. (C) Hybridation de la sonde LSI CSF1R (5q33-q34) Spectrum Orange/D5S23, D5S721 Spectrum green montrant une délétion du signal rouge sur une métaphase représentative. (D) Hybridation de la sonde BAC RP11-299D9 montrant trois signaux respectivement localisés sur le chromosome 21 normal et sur les deux chromosomes der(7) et der(21). Ce profil d'hybridation suggère une cassure localisée entre les exons 2 à 8 de *RUNX1*. (E) Hybridation de la sonde BAC RP11-771C10 montrant la présence de deux signaux respectivement localisés sur le chromosome 21 normal et sur le chromosome der(21). (F) Hybridation de la sonde BAC RP11-805P12 révélant trois signaux respectivement localisés sur le chromosome 7 normal et sur les deux chromosomes der(7) et der(21). Ce profil d'hybridation suggère la présence d'une cassure située à la bande chromosomique 7p22.1 ciblant le locus du gène *USP42*.

3.2.2 Identification du gène partenaire de la t(7;21)(p22;q22) : *USP42*

Au niveau du bras court du chromosome 7, aucun gène partenaire de *RUNX1* n'était connu à ce moment de l'analyse. Une étude par FISH avec des sondes BACs a été initiée, en adoptant une stratégie de marche sur le chromosome et une approche par gènes candidats. Un premier groupe de gènes impliqués dans les leucémies a été étudié. L'utilisation de la sonde BAC RP11-1132K14, couvrant le locus *HOXA* localisé à la bande chromosomique 7p15, a généré deux signaux sur le chromosome 7 normal et sur le der(7), suggérant un point de cassure télomérique. L'utilisation de la sonde RP11-692L4 (gène *ETV1* ; bande 7p21.2) a aussi généré deux signaux localisés sur le

chromosome 7 normal et sur le der(7), indiquant un point de cassure encore plus télomérique. Trois loci ont alors été étudiés par BACs : *USP42* en 7p22.1 (RP11-164P11, RP11-805P12, RP11-2K20), *PMS2* en 7p22.1 (RP11-90J23) et *NUDT1* en 7p22.2 (RP11-296K15).

L'hybridation du BAC RP11-90J23, ciblant *PMS2*, a généré deux signaux localisés sur le chromosome 7 normal et sur le der(21), suggérant un point de cassure centromérique à ce gène. La région du gène *USP42*, centromérique au locus de *PMS2*, a ensuite été ciblée. L'analyse par FISH avec la sonde BAC RP11-805P12 a révélé trois signaux, localisés sur le chromosome 7 normal et sur les chromosomes der(7) et der(21), confirmant l'implication de la bande 7p22.1 et du locus *USP42* au sein de cette t(7;21)(p22;q22) (Fig. 3.2F). L'étendu du BAC RP11-805P12 (180 kb) n'a cependant pas permis d'identifier avec précision le gène partenaire puisque celui-ci couvrait trois gènes : *EIF2AK1*, *USP42* et *CYTH3*. L'utilisation de la sonde RP11-2K20, ne couvrant que deux de ces trois gènes, a permis d'éliminer le gène *EIF2AK1* puisqu'un signal divisé localisé sur les chromosomes der(7) et der(21) et un signal localisé sur le chromosome 7 normal étaient encore détectés avec cette sonde.

À ce moment de notre investigation, un article décrivant la fusion des gènes *RUNX1* et *USP42* « Ubiquitin Specific Peptidase 42 » chez un enfant atteint de LAM avec différenciation minimale (LAM M0) a été publié (Paulsson et al., 2006). Le gène *USP42*, codant pour une déubiquitinase, a alors été décrit pour la première fois comme

partenaire de fusion de *RUNXI* dans la leucémie. Une description détaillée des caractéristiques cliniques de ce patient nous a permis de faire ressortir certaines caractéristiques communes partagées par notre sujet adulte dont la positivité pour les marqueurs CD7 et CD56 ainsi que la présence d'une délétion interstitielle du bras long du chromosome 5. Puisque notre travail de caractérisation par BAC suggérait l'implication probable de *USP42*, nous avons initié la recherche d'une fusion *RUNXI-USP42* par RT-PCR dans notre cas.

3.3 Identification des transcrits des fusions *RUNXI-USP42* et *USP42-RUNXI*

3.3.1 Analyse des transcrits de la fusion principale *RUNXI-USP42*

La description moléculaire de la fusion *RUNXI-USP42* fournie par Paulsson et collaborateurs nous a permis de sélectionner des amorces spécifiques ciblant les exons 4 à 7b de *RUNXI* et les exons 3 et 4 de *USP42*. Des RT-PCR ont été réalisées sur l'ARN total extrait des cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient présentant la t(7;21)(p22;q22) à l'aide de l'ensemble « OneStep RT-PCR kit » de Qiagen et des amorces spécifiques sens *RUNX1_ex4,5F* et anti-sens *USP42_ex3R* (Table 2.5). Les conditions d'amplification suivantes ont été utilisées : 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 60°C pendant 45 secondes et d'extension à 72°C pendant une minute.

Au moins deux bandes d'amplification (593 pb et 401 pb) ont été identifiées par cette méthode (Figs. 3.3 ; 3.4A). Le séquençage de la bande d'amplification principale (T1, 593 pb) a suggéré une fusion respectant le cadre de lecture entre l'exon 7b de *RUNX1* et l'exon 3 de *USP42* (Figs. 3.4A-3.4D). Afin de confirmer la validité de ce résultat, une amorce localisée dans l'exon 7b de *RUNX1* (*RUNX1_ex7F*) a été utilisée en combinaison avec l'amorce *USP42_ex3R* ou avec une amorce localisée dans l'exon 4 de *USP42* (*USP42_ex4R*). Des bandes uniques de 213 pb et de 375 pb ont été détectées respectivement avec les combinaisons d'amorces *RUNX1_ex7F* et *USP42_ex3R* et *RUNX1_ex7F* et *USP42_ex4R* (Fig. 3.3). L'isolation et le séquençage de ces bandes nous ont permis de confirmer l'expression d'un transcrit principal de fusion *RUNX1-USP42* résultant de la $t(7;22)(p22;q22)$ chez le patient 04H120.

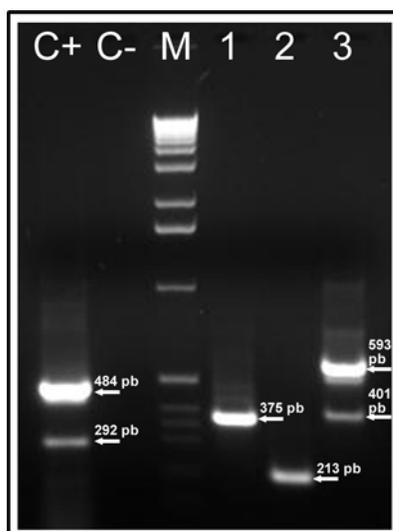


Figure 3.3. Gel de bromure d'éthidium montrant les différents transcrits de fusion *RUNX1-USP42* amplifiés par RT-PCR à partir de l'ARN total extrait des cellules

mononuclées du patient avec la t(7;21)(p22;q22). C+, contrôle positif de la RT-PCR correspondant à l'amplification des exons 4 à 7b de l'allèle non réarrangé de *RUNXI* à l'aide des amorces RUNX1_ex4F et RUNX1_ex7R2. Un transcrit majoritaire (484 pb) et un transcrit alternatif résultant de l'épissage de l'exon 6 de *RUNXI* (292 pb) sont détectés. C-, contrôle négatif sans ARN ; M, marqueur moléculaire de 1 kb. Puit 1, amplification de l'ADN complémentaire (ADNc) de la fusion *RUNXI-USP42* à l'aide des amorces RUNX1_ex7F et USP42_ex4R. Une bande unique de 375 pb est détectée correspondant à une fusion entre l'exon 7b de *RUNXI* et l'exon 3 de *USP42*. Puit 2, amplification de l'ADNc de la fusion *RUNXI-USP42* à l'aide des amorces RUNX1_ex7F et USP42_ex3R. Une bande unique d'amplification de 213 pb est détectée. Puit 3, amplification de l'ADNc de la fusion *RUNXI-USP42* à l'aide des amorces RUNX1_ex4,5F et USP42_ex3R. Deux transcrits de 593 pb et de 401 pb sont détectés.

L'isolation et le séquençage de la seconde bande (T2, 401 pb) ont également montré une fusion qui respectait le cadre de lecture entre l'exon 7b de *RUNXI* et l'exon 3 de *USP42*. Le poids inférieur du produit s'explique par la présence d'une délétion complète de l'exon 6 de *RUNXI*, sans ajout de nucléotide à la jonction des exons 5 et 7b du gène. La délétion de l'exon 6 de *RUNXI* a fréquemment été rapportée dans les fusions impliquant ce gène (Mikhail et al., 2004; Paulsson et al., 2006; Dai et al., 2009; Giguere and Hebert 2010). Cependant, ces transcrits résultant de l'épissage alternatif de l'exon 6 sont également décrits dans des conditions normales, supportant que cet évènement ne soit probablement pas relié à la leucémogénèse (Miyoshi et al., 1995).

La migration lente du produit de PCR sur un gel d'agarose 2 % a révélé une troisième bande d'amplification (~500 pb), laquelle a été clonée et séquencée. Cette étape de clonage nous a permis d'identifier qu'il s'agissait d'un artefact de RT-PCR plutôt qu'un produit spécifique de fusion. En fait, à la façon d'un dimère d'amorce, les transcrits T1 et T2 s'associent lors des cycles répétitifs de RT-PCR et forment un produit qui migre distinctement entre les deux transcrits de fusion.

Vu la conservation du cadre de lecture au sein des deux principaux transcrits de fusion T1 et T2, l'expression de protéines chimériques RUNX1-USP42 est attendue. À l'aide de l'ensemble « OneStep RT-PCR kit » de Qiagen et des amorces RUNX1_ex1F et RUNX1_ex8R (allèle sauvage) puis RUNX1_ex1F et USP42_ex3R (allèle réarrangé), une analyse des exons 3 à 5 des allèles sauvages et réarrangés de *RUNX1* a été réalisée, nous permettant de confirmer l'absence de mutation au sein de ces exons pour chacun des allèles. La préservation des exons codants pour le domaine RHD nous permet de prédire que ce domaine est exprimé par les protéines chimériques et sauvages et donc que les capacités de liaison à l'ADN et d'hétérodimérisation avec le CBFβ sont conservées par les protéines chimériques présumées (Fig. 3.4E). Or, l'épissage alternatif de l'exon 6 engendre la perte des cinq derniers acides aminés du RHD, tel que prédit par le site PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), affectant possiblement la fonction de ce domaine dans les formes subissant l'épissage. De plus, la présence de l'exon 7b dans les transcrits de fusion permet possiblement l'expression d'une portion du domaine TAD/ID et plus spécifiquement, l'expression de la région d'activation transcriptionnelle TE3 au

sein des protéines chimériques prédites (Fig. 3.4E). Le séquençage partiel des exons 3 à 11 de l'allèle *USP42* réarrangé (amorces RUNX1_ex7F et USP42_ex14R) nous a également permis de confirmer l'absence de mutation au sein des exons codant pour le domaine catalytique « ubiquitin specific peptidase » (USP) de *USP42* et de proposer que ce domaine soit exprimé et capable de réaliser sa fonction catalytique au sein des protéines chimériques (Fig. 3.4E). L'analyse mutationnelle du domaine USP codé par l'allèle *USP42* normal n'a pas été permise à l'aide d'amorces localisées dans l'exon 1 et dans l'exon 17 de *USP42*, possiblement en raison de la grande taille de l'ARNm (5135 pb). Il est à noter que les séquences nucléotidiques sauvages de *RUNX1* et de *USP42* ont été tirées du site « UCSC Genome Browser », version GRCh37/hg19 et que les séquences d'acides aminées des domaines RHD et USP ont été obtenues des bases de données « PFAM » (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) et « Conserved Domain » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

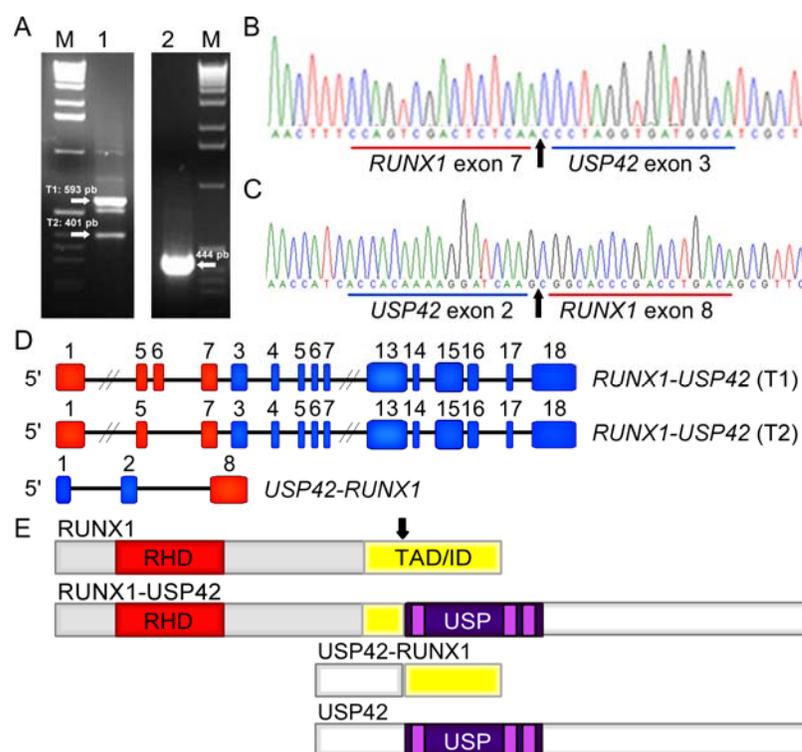


Figure 3.4. Analyse moléculaire des transcrits de fusion *RUNX1-USP42* et *USP42-RUNX1*. (A) Gel de bromure d'éthidium montrant les transcrits des fusions *RUNX1-USP42* (T1 et T2) et *USP42-RUNX1* amplifiés par RT-PCR à partir des cellules mononuclées du patient présentant la t(7;21)(p22;q22). M, marqueur moléculaire de 1 kb. Puit 1, deux transcrits spécifiques de la fusion *RUNX1-USP42* sont indiqués par des flèches (T1, 593 pb : T2, 401 pb). Puit 2, la fusion *USP42-RUNX1* est indiquée par une flèche (444 pb). (B) Séquence partielle du transcrit T1 de la fusion principale *RUNX1-USP42*. La jonction entre l'exon 7b de *RUNX1* et l'exon 3 de *USP42* est indiquée par une flèche. (C) Séquence partielle du transcrit de la fusion réciproque *USP42-RUNX1*. La jonction entre l'exon 2 de *USP42* et l'exon 8 de *RUNX1* est indiquée par une flèche. (D) Représentation schématique des deux transcrits de la fusion *RUNX1-USP42* (T1 et T2) et du transcrit réciproque *USP42-RUNX1*. Les exons de *RUNX1* (rouge) et les exons de *USP42* (bleu) sont représentés. (E) Représentation schématique des protéines sauvages *RUNX1* et *USP42* ainsi que des protéines chimériques *RUNX1-USP42* et *USP42-RUNX1* prédites engendrées lors de la t(7;21)(p22;q22). La flèche

indique la localisation du point de cassure. RHD, « Runt homology domain » ; TAD/ID, domaine de régulation transcriptionnelle ; USP, domaine « ubiquitin specific peptidase ».

3.3.2 Analyse du transcrit de la fusion réciproque *USP42-RUNX1*

L'amplification d'un transcrit de fusion réciproque *USP42-RUNX1* a été effectuée à l'aide de l'ensemble « OneStep RT-PCR kit » de Qiagen et des amorces sens *USP42_ex2F* et anti-sens *RUNX1_ex8R* (Table 2.5). Une bande unique de 444 pb a été détectée sur un gel d'agarose. L'isolation et le séquençage de cette bande ont révélé un produit spécifique de fusion entre l'exon 8 de *RUNX1* et l'exon 2 de *USP42* respectant le cadre de lecture (Figs. 3.4A ; 3.4C-3.4D).

La préservation du cadre de lecture prédit l'expression d'une protéine réciproque de fusion codée à partir du site d'initiation de la traduction localisé dans l'exon 2 de *USP42*. La protéine chimérique réciproque prédite comprend, en théorie, 80 acides aminés codés par l'exon 2 de *USP42* et 158 acides aminés codés par l'exon 8 de *RUNX1*. Une fusion avec l'exon 8 engendre une dissociation du domaine TAD/ID et entraîne la perte de la région d'activation transcriptionnelle TE3 de *RUNX1*, laquelle s'exprime plutôt au sein de la fusion principale. La région TE1 est dissociée et partiellement exprimée alors que la région TE2 et la portion inhibitrice du domaine TAD/ID sont entièrement conservées au sein de la chimère *USP42-RUNX1* prédite (Fig. 3.4E).

3.4 Identification de la jonction génomique des fusions *RUNX1-USP42* et *USP42-RUNX1*

3.4.1 Analyse de la jonction génomique de la fusion principale *RUNX1-USP42*

Les transcrits T1 et T2 fusionnent tous deux l'exon 7b de *RUNX1* avec l'exon 3 de *USP42* suggérant l'existence d'un point de cassure génomique dans l'intron 7b de *RUNX1* (6,69 kb) et dans l'intron 2 de *USP42* (3,95 kb). À l'aide de l'ensemble de PCR « *Taq* Platinum Polymerase High fidelity » de Invitrogen et de plusieurs combinaisons d'amorces, nous avons identifié la jonction génomique de la fusion principale *RUNX1-USP42*. Différentes conditions d'amplification ont été testées jusqu'à l'obtention de produits spécifiques d'amplification avec les amorces sens localisées dans l'intron 7b de *RUNX1* (*RUNX1_int7F*, *RUNX1_int7F1*) et les amorces anti-sens localisées dans l'intron 2 de *USP42* (*USP42_int2R*). Les conditions d'amplification suivantes ont été utilisées : 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 60°C pendant 30 secondes et d'extension à 68°C pendant 3 minutes.

Des éléments caractéristiques de certains mécanismes de réparation de l'ADN ont été recherchés dans les séquences adjacentes au point de cassure de la fusion principale. Plus spécifiquement, des séquences « RSS » typiques d'une recombinaison VDJ, des

séquences répétées de type ALU indiquant une recombinaison homologue et de longues ou de courtes homologies de séquence (1 à 30 pb) suggérant une recombinaison non-homologue de type NHEJ ont été recherchées. Nous avons également recherché la présence de sites de clivage de l'enzyme TOP2, correspondant à la séquence consensus dégénérée [A/G N T/C N N C N N G T/C N G G/T T N T/C N T/C] (Spitzner and Muller 1988). De plus, nous avons porté une attention particulière à la détection de nucléotides N « non-template » additionnels, d'inversion, de délétion, de duplication ou d'insertion de séquences au point de jonction de cette fusion. Enfin, la présence de séquences répétées a été approfondie à l'aide de l'outil bioinformatique « Repeat Masker » (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>).

Le séquençage du produit d'amplification de l'ADN génomique a révélé une fusion entre l'intron 7b de *RUNXI* (chr21:36167501-36167502) et l'exon 2 de *USP42* (chr7:6150914-6150915) (EMBL-Bank Accession no. FR727326). Dû à la présence d'un nucléotide partagé par les séquences de *RUNXI* et de *USP42* (C ; chr21:36167501 et chr7:6150914), le point de cassure précis de la fusion principale n'a pu être déterminé avec exactitude. En plus du nucléotide « C » identifié à cette jonction, notre analyse a révélé la présence d'une homologie de sept nucléotides (ACTTTCT ; chr7:6150917-6150923 et chr21:36167489-36167495) tout près du point de cassure de cette fusion (Fig. 3.5A). L'analyse du transcrit principal seul n'a révélé aucune séquence inversée, dupliquée ou délétée près du point de cassure. L'identification du point de cassure de la fusion réciproque et l'analyse détaillée de cette séquence nous ont cependant permis

d'identifier une région de 250 nucléotides partagée par les deux fusions *RUNX1-USP42* et *USP42-RUNX1* (Figs. 3.5A-3.5D).

Un nouveau site de clivage *in vitro* pour l'enzyme TOP2, partageant 100 % d'homologie avec la séquence consensus dégénérée, a été identifié dans l'intron 2 de *USP42* [GTTAACCAGTAGTTATTC; chr7:6151618-6151635] à 703 pb du point de cassure de la fusion principale *RUNX1-USP42* (Fig. 3.5A). Il est intéressant de noter que l'intron 2 de *USP42* est particulièrement riche en motifs ALU, représentant plus de 38,8 % de la séquence complète de l'intron 2 selon l'outil bioinformatique « Repeat Masker ». Or, l'intron 7b de *RUNX1* ne possède qu'un seul site ALU, représentant 4,5 % de l'intron. Puisque aucune séquence répétée de type ALU n'a été détectée à la jonction de la fusion principale, une recombinaison homologe via ces éléments est peu probable.

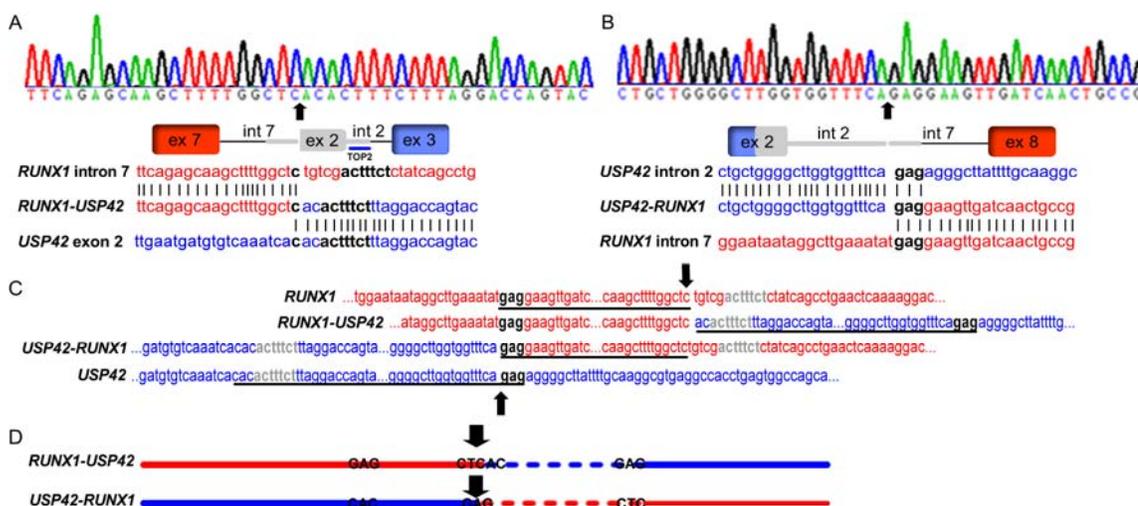


Figure 3.5. Jonctions d'ADN génomique des fusions *RUNX1-USP42* et *USP42-RUNX1* identifiées par PCR à partir de l'ADN génomique extrait des cellules

mononuclées du patient présentant la t(7;21)(p22;q22). (A) Séquence partielle de la fusion *RUNX1-USP42* montrant un point de cassure génomique dans l'intron 7b de *RUNX1* (séquences rouges) et dans l'exon 2 de *USP42* (séquences bleues). Un nucléotide homologue (C ; noir) est identifié directement à la jonction de la fusion. Une microhomologie de 7 nucléotides (ACTTTCT ; noir) et un nouveau site de clivage *in vitro* de la topoisomérase II (TOP2, trait bleu) sont aussi identifiés près du point de cassure de la fusion principale (flèche). La boîte et les lignes grises représentent la région partagée de 250 nucléotides entre les deux fusions. (B) Séquence partielle de la fusion *USP42-RUNX1* montrant un point de cassure génomique dans l'intron 2 de *USP42* et dans l'intron 7b de *RUNX1*. Une microhomologie de 3 nucléotides (GAG ; noir) est identifiée au point de cassure de la fusion réciproque. (C) Séquence partielle de l'ADN adjacent au point de cassure des fusions *RUNX1-USP42* et *USP42-RUNX1*. Un alignement via la microhomologie GAG (en noir) détectée dans l'intron 7 de *RUNX1* et dans l'intron 2 de *USP42* est montré. La région de séquences partagées est soulignée en noir et l'homologie de 7 nucléotides est représentée en gris. (D) Représentation schématique des régions d'insertion partagées par les fusions *RUNX1-USP42* et *USP42-RUNX1* (tirets rouges, *RUNX1* ; tirets bleus, *USP42*). Les triplets GAG-CTC et CAC-GAG délimitant les segments d'ADN dupliqués des fusions principales et réciproques sont représentés. ex, exon ; int, intron.

3.4.2 Analyse de la jonction génomique de la fusion réciproque *USP42-RUNX1*

L'utilisation de diverses combinaisons entre les amorces USP42_int1F ou USP42_ex2F1 et RUNX1_int7R ou RUNX1_int7R1 nous a permis d'identifier la jonction génomique de la fusion réciproque *USP42-RUNX1*. Le séquençage a révélé des points de cassure localisés dans l'intron 2 de *USP42* (chr7:6151077-6151080) et dans l'intron 7b de

RUNXI (chr21:36167582-36167585) (EMBL-Bank Accession no. FR727327) (Fig. 3.5B). L'identification de la position exacte du point de cassure n'a pas été possible dû à la présence d'une microhomologie de trois nucléotides [GAG] identifiée directement à la jonction de cette fusion. Il était donc impossible de déterminer l'appartenance de cette séquence GAG puisqu'elle se retrouvait normalement dans l'intron 7b de *RUNXI* (chr21:36167582-36167584) et dans l'intron 2 de *USP42* (chr7:6151078-6151080).

L'analyse bioinformatique des séquences génomiques adjacentes à la jonction de la fusion réciproque n'a pas révélé de délétion, d'inversion, de duplication ou d'insertion de séquence au point de cassure. La comparaison des deux jonctions a cependant confirmé la présence de segments d'ADN partagés par les deux fusions, totalisant 250 nucléotides. Cette région partagée se compose de 84 nucléotides de l'intron 7b de *RUNXI*, de 91 nucléotides de l'exon 2 de *USP42* et de 75 nucléotides de l'intron 2 de *USP42* (Figs. 3.5C-3.5D). Un évènement similaire, présentant une région partagée de 268 pb, a été rapporté qu'une seule fois chez un patient atteint de LAM présentant une $t(17;19)(q23;q13.32)$ (Poland et al., 2009). La présence de cette séquence partagée présente en deux copies dans le génome indique un débalancement de la translocation sur le plan génomique, tel que vu dans plusieurs réarrangements chromosomiques étudiés à ce jour (Zhang and Rowley 2006).

De façon intéressante, cette région partagée n'est pas structurée de façon identique dans les deux fusions. Cette région se compose notamment de l'intron 7b de *RUNXI*, de

l'exon 2 et de l'intron 2 de *USP42* dans la fusion principale alors que l'on retrouve dans l'ordre, les séquences de l'exon 2 et de l'intron 2 de *USP42* puis de l'intron 7b de *RUNXI* dans la fusion réciproque. Cette même structure de la région partagée a également été décrite dans les jonctions dérivées de la t(17;19)(q23;q13.32) (Poland et al., 2009). L'orientation non conservée de cette région partagée nous laisse croire qu'une origine découlant d'une simple duplication engendrée par le NHEJ est moins probable. Puisque cette séquence dérive de *RUNXI* et de *USP42*, elle ne peut pas non plus être décrite comme un ajout de matériel additionnel « N », mais doit être considéré comme l'ajout de matériel T dit « template ». Selon la structure et la composition des deux jonctions, nous proposons que ces segments partagés se composent d'un segment d'ADN de l'intron 7b de *RUNXI* et d'un segment de l'exon 2/intron 2 de *USP42* puissent d'abord avoir été dupliqués et ensuite insérés aux jonctions de la fusion principale et réciproque lors de la recombinaison des extrémités cassées. L'ordre des événements ne peut cependant pas être établi avec certitude, mais nous sommes d'avis que pour générer ce type de jonction complexe, plus d'un événement est requis. Malgré la complexité de ces jonctions génomiques, la présence de microhomologies et de régions dupliquées insérées aux points de cassure de nos deux fusions récapitulent les caractéristiques du mécanisme de recombinaison non-homologue de type NHEJ et supportent l'idée qu'une réparation erronée via ce mécanisme puisse être à l'origine de cette t(7;21)(p22;q22). Une explication plus détaillée des mécanismes proposés sera fournie dans la discussion à la section 8.3.

3.5 USP42, une « ubiquitin specific peptidase » peu connue

USP42 est un gène de dix-huit exons (ADN de 56 kb ; ARNm de 5135 pb) localisé à la bande chromosomique 7p22.1 qui code pour une protéase faisant partie de la grande famille des « Ubiquitin Specific Peptidases » (USP) (Nijman SM 2005; Komander et al., 2009). Les membres de cette famille sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires dont principalement la déconjugaison des groupements d'ubiquitines. Cette activité de déconjugaison (aussi déubiquitination) est exécutée par le domaine catalytique conservé des USP nommé domaine USP lequel se compose d'une triade catalytique classiquement formée de résidus cystéines, histidines et/ou asparagines. Outre cette triade, une grande diversité est rapportée dans les séquences localisées au niveau des parties N- et C-terminales des USP. Un rôle propre à chaque USP a été proposé pour ces séquences variables, déterminant possiblement la localisation cellulaire et la spécificité du substrat (Quesada V 2004).

Les USP régulent le pool d'ubiquitines libres et modulent également le nombre d'ubiquitines attachées à une cible par l'hydrolyse du lien amine existant entre une chaîne polyubiquitine ou entre une ubiquitine et un résidu lysine d'un substrat. Les USPs ont aussi comme fonction d'assurer la fidélité du processus d'ubiquitination des protéines destinées à la dégradation par le protéasome. En effet, l'ubiquitination est une modification qui a longtemps été essentiellement associée à un pouvoir de dégradation. Plus récemment, il a été démontré que l'ubiquitination est une modification qui contrôle,

non seulement la demi-vie d'une protéine, mais aussi la localisation et l'activité d'une protéine. L'ubiquitination contribue à la régulation de la transcription d'une cible en modifiant l'état d'ubiquitination de certaines histones de la chromatine (Komander et al., 2009; Reyes-Turcu et al., 2009). Ainsi, le nombre de résidus ubiquitines, le résidu lysine sur lequel l'ubiquitine est attachée et le type de chaîne générée sont maintenant des facteurs essentiels à la compréhension du processus d'ubiquitination et de déubiquitination.

USP42 (1316 acides aminés ; 145 kDa) a été identifié en 2004 (Quesada et al., 2004). Autant chez l'homme que chez la souris, USP42 possède une activité catalytique démontrée par des essais enzymatiques confirmant une capacité d'hydrolyse des molécules ubiquitines attachées à la protéine β -galactosidase (Quesada et al., 2004; Kim et al., 2007). Toutefois la majorité de ses substrats et ses fonctions demeurent toujours inconnus. Récemment, une équipe a démontré une expression majoritairement nucléaire de l'enzyme USP42 (faible expression cytoplasmique aussi détectée). Ils ont aussi montré une interaction entre la région C-terminale de USP42 et la protéine p53, permettant en condition de stress, de stabiliser p53 par déubiquitination (Hock et al., 2011). Ces chercheurs ont également démontré l'existence de plusieurs isoformes de USP42 quoique les tailles et les fonctions de celles-ci n'ont pas été précisées. Chez l'homme, *USP42* est exprimée dans la moelle osseuse normale, dans des échantillons de patients atteints de LAM et dans des lignées de cancers variés (Paulsson et al., 2006). Son ARNm de 5 kb s'exprime fortement dans le pancréas, le muscle squelettique, le foie

et plus faiblement dans le placenta, le cœur et le cerveau. Une absence d'expression a été décrite dans le thymus, les ovaires, les testicules et la prostate (Quesada et al., 2004). Chez la souris, l'ARNm d'*Usp42* s'exprime dans plusieurs tissus, mais principalement dans les testicules, le cerveau, les poumons et le thymus (Kim et al., 2007).

3.6 Évaluation de l'incidence de la fusion *RUNXI-USP42* dans les cancers hématologiques

La t(7;21)(p22;q22) est une anomalie chromosomique difficile à identifier par cytogénétique standard ; elle pourrait donc être beaucoup plus fréquente. En effet, depuis la publication du premier cas de LAM M0 pédiatrique présentant la t(7;21)(p22;q22), six autres patients ont été rapportés incluant le présent cas (Paulsson et al., 2006; Foster et al., 2010; Jeandidier et al., 2010; Giguere and Hebert 2011). La t(7;21)(p22;q22) est donc une translocation récurrente des néoplasies hématologiques (LAM et SMD *de novo*) (Table 3.1). Étant donné la nature semi-cryptique de cette anomalie, une étude visant à évaluer l'incidence de la fusion *RUNXI-USP42* dans une série de cancers hématologiques a été réalisée en utilisant deux méthodes complémentaires. Une analyse par RT-PCR a été effectuée afin d'identifier d'autres échantillons positifs pour le gène de fusion *RUNXI-USP42*. En parallèle, une étude visant à détecter par qRT-PCR une expression anormalement élevée du gène *USP42* a été réalisée.

#	Âge	Sexe	Cancer primaire	Cytogénétique	Point de cassure de <i>RUNX1</i>	Point de cassure de <i>USP42</i>	Fusion réciproque	Références
1	32	Homme	LAM M1	46,XY,del(5)(q22q33), t(7;21)(p22;q22)[20]	exon 7 (intron 7)	exon 3 (intron 2)	Oui	Cas présent
2	68	Femme	SMD	46,XX,t(7;21)(p22;q22)[12]/92,idemx2[21]/46,XX[17]	exon 6 (intron 6*)	exon 3 (intron 2*)	Non	Foster et coll., 2010
3	68	Homme	LAM M5	46,XY,t(7;21)(p22;q22)[14]/46,XY[11]	exon 7 (intron 7*)	exon 3 (intron 2*)	Oui	Foster et coll., 2010
4	7	Homme	LAM M0	46,XY,t(7;21)(p22;q22)	exon 7 (intron 7)	exon 3 (intron 2)	Non	Paulsson et coll., 2006
5	?	?	LAM	89,XXYY,der(5)t(5;13)(q23;q?),t(7;21)(p22;q22),-15,-17,-18	exon 7 (intron 7*)	exon 3 (intron 2*)	Oui	Jeandidier et coll., 2010
6	?	?	LAM	46,XY?,del(5)(q31q33), t(7;21)(p22;q22).	exon 5 (intron 5*)	exon 3 (intron 2*)	Oui	Jeandidier et coll., 2010
7	?	?	LAM	46,XY?,t(7;21)(p22;q22)/92,XXYY?,der(5)t(1;5)(q3?2;q21~23),t(7;21)(p22;q22)	exon 7 (intron 7*)	exon 3 (intron 2*)	Oui	Jeandidier et coll., 2010

Table 3.1. Caractéristiques des sept spécimens rapportés dans la littérature présentant une t(7;21)(p22;q22) et une fusion *RUNX1-USP42*. LAM M1, leucémie myéloïde aiguë sans maturation ; SMD, syndrome myélodysplasique ; LAM M5, leucémie monoblastique/monocytaire aiguë ; LAM M0, leucémie myéloïde aiguë avec différenciation minimale ; ?, donnée non disponible ; *, point de cassure non confirmé.

3.6.1 Incidence de la fusion *RUNX1-USP42* dans les néoplasies hématologiques

Des RT-PCR ont d'abord été réalisées sur l'ARN total extrait des cellules mononuclées de 98 échantillons de moelle osseuse ou de sang périphérique de patients atteints de différentes néoplasies hématologiques. Ces cas ont été sélectionnés en fonction de certains paramètres incluant la positivité des cellules blastiques pour les marqueurs CD7 et/ou CD56. En effet, une co-expression aberrante des marqueurs CD7 et CD56 a été

retrouvée chez le premier cas rapporté de LAM avec $t(7;21)(p22;q22)$ ainsi que chez notre cas, justifiant une sélection de 43 spécimens de LAM positifs pour ces marqueurs. Des spécimens avec des caryotypes normaux ($n = 38$), des délétions du bras long du chromosome 5 ($n = 4$), des anomalies du bras court du chromosome 7 ($n = 2$) ou d'autres anomalies cytogénétiques ($n = 10$) ont également été inclus dans cette étude. Des néoplasies hématologiques variées et divers types morphologiques de leucémies ont été sélectionnés pour cette étude, regroupant des LAM avec différenciation minimale ($n = 6$), des LAM sans maturation ($n = 44$), des LAM avec maturation ($n = 16$), des leucémies myélomonocytaires aiguës ($n = 7$), des leucémies monoblastiques/monocytaires aiguës ($n = 12$), des LAM avec changements myélodysplasiques ($n = 6$), des LMC-PB ($n = 2$), un SMD ($n = 1$), une LPA avec $t(15;17)(q24;q21)$ ($n = 1$), une LAM avec $t(8;21)(q22;q22)$ ($n = 1$), une leucémie érythroïde aiguë ($n = 1$) et une LAM à cellules NK « natural killer » ($n = 1$).

À l'aide des amorces *RUNX1_ex4,5F* et *USP42_ex3R* et de l'ensemble « OneStep RT-PCR kit » de Qiagen, nous avons tenté d'amplifier une fusion *RUNX1-USP42* dans ces 98 échantillons. L'utilisation de ces amorces permettait à la fois l'identification des deux transcrits alternatifs de fusion identifiés dans notre étude et l'identification d'une fusion entre l'exon 6 de *RUNX1* et l'exon 3 de *USP42* rapportée par Foster et collaborateurs chez un patient atteint de SMD (Table 3.1). Aucun autre cas présentant une fusion *RUNX1-USP42* n'a été identifié à l'aide de cette méthode (Fig. 3.6), nous permettant

d'établir une fréquence inférieure à 1 % pour cette anomalie dans notre cohorte de 98 spécimens.

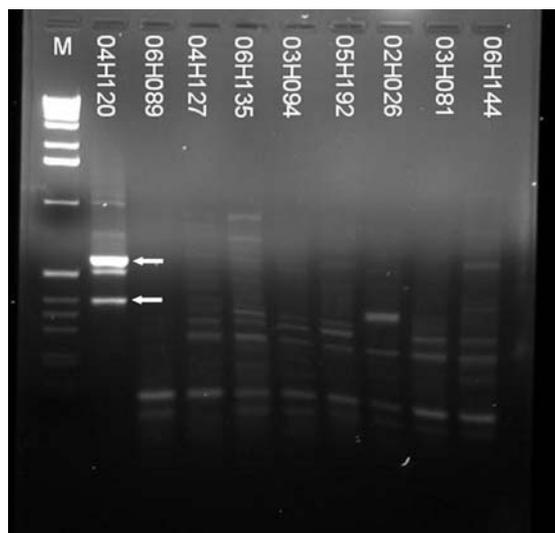


Figure 3.6. Gel de bromure d'éthidium montrant l'absence d'amplification par RT-PCR de la fusion *RUNXI-USP42* dans les échantillons de néoplasies hématologiques étudiés. Au moins deux transcrits de fusion *RUNXI-USP42* (flèches blanches) ont été amplifiés dans les cellules du spécimen 04H120 servant de contrôle positif. Aucune bande d'amplification spécifique n'a été observée dans les huit autres échantillons testés à l'aide des amorces *RUNX1_ex4,5F* et *USP42_ex3R* dans cette expérience représentative. M, marqueur moléculaire de 1 kb.

3.6.2 Analyse quantitative de l'expression de *USP42* dans divers spécimens de néoplasies hématologiques

Une étude de qRT-PCR a aussi été entreprise afin de vérifier une possible surexpression de *USP42* dans les cellules du patient 04H120 présentant la $t(7;21)(p22;q22)$. Suite à

cette translocation, les séquences codantes de *USP42* sont déplacées devant le puissant promoteur de *RUNXI*, menant à une dérégulation possible de son expression. Une série de 81 ADNc a été utilisée. Les ADNc ont été synthétisés à partir d'ARN total, de « random primers » et de l'ensemble « First-strand cDNA synthesis » de Invitrogen. Deux millions de cellules CD34⁺ purifiées à partir d'un échantillon de moelle osseuse normale, 71 échantillons de néoplasies hématologiques, 4 lignées de LMC-PB (MC3, K562, KU812, MEG01), 3 échantillons de sang périphérique de donneurs normaux et 2 échantillons de moelle osseuse normale (morphologie normale et caryotype normal) ont été étudiés (Annexe, table 9.1). Chaque échantillon de moelle osseuse normale a indépendamment servi de calibrateur (05H028, 05H159). Les gènes contrôles *GAPDH* et *ARN 18S* ont été utilisés dans cette étude (Table 2.7). En théorie, l'expression du gène contrôle doit être constante entre chaque échantillon étudié et son profil d'expression doit être similaire au gène étudié. Puisque les valeurs de Ct de *GAPDH* étaient plus proches des valeurs de *USP42*, ce dernier a été sélectionné pour l'analyse finale.

L'analyse par quantification relative a montré des valeurs de RQ supérieures à 5 chez le patient 04H120 présentant la t(7;21)(p22;q22), et ce, avec chacun des calibrateurs étudiés (calibrateur 05H028 : $RQ_{04H120} = 7,35$ et calibrateur 05H159 : $RQ_{04H120} = 35,70$), suggérant la présence d'une surexpression de *USP42* dans ces cellules. Une importante différence d'expression de *USP42* entre les deux échantillons de moelle normale (05H028, $RQ_{moy} = 2,93$; 05H159 $RQ_{moy} = 0,6$) et une déviation standard élevée (mesure de la variation d'une série de valeurs par rapport à la moyenne, $SD_{moyen} = 1,61$)

expliquent la variation des RQ identifiés pour le patient 04H120. La variabilité de la composition cellulaire des moelles osseuses normales pourrait aussi expliquer cette différence. Dû à cette variabilité, la moelle osseuse normale présentant la valeur de RQ la plus élevée a été retenue dans l'analyse finale (05H028), nous permettant d'identifier une possible surexpression de *USP42* dans les autres spécimens étudiés. Malgré cet ajustement, aucun autre échantillon ne présentait de surexpression de *USP42*. Lorsqu'une moyenne des deux valeurs de RQ obtenues pour chaque calibrateur a été calculée, correspondant à un RQ_{moy} , le patient 04H120 ($RQ_{moy} = 21,52$) et les trois échantillons de sang périphérique normal ($RQ_{moy} = 7,18; 6,57$ et $8,05$) ont révélé une surexpression de *USP42* suggérant également une plus forte expression de cet ARNm dans les lymphocytes normaux circulants par rapport à la moelle normale.

Afin de confirmer la surexpression de *USP42* chez le patient 04H120 présentant la $t(7;21)(p22;q22)$, nous avons réalisé une seconde étude de qRT-PCR sur un total de 31 échantillons incluant 27 spécimens de LAM, la lignée Kasumi-1 et 3 spécimens de moelle osseuse normale (Annexe, table 9.2). L'ADNc a été synthétisé à partir d'ARN total, de « random primers » et de l'ensemble « First-strand cDNA synthesis » de Invitrogen. Les contrôles *GAPDH* et *ARN 18S* ont été utilisés comme contrôles endogènes. *GAPDH* a été retenu pour l'analyse finale tandis que la moelle osseuse normale dérivée d'un donneur sain (échantillon 07H140) a servi de calibrateur (Table 2.7).

Cette étude de validation nous a permis de confirmer la surexpression de *USP42* chez le patient 04H120 ($RQ_{07H140} = 11,57$). Toutefois, aucun autre spécimen n'a démontré de surexpression de *USP42* (Fig. 3.7A). L'utilisation de trois moelles osseuses normales différentes de la première étude nous a permis d'obtenir des résultats d'expression plus homogènes, tel qu'en témoigne la similarité des valeurs de RQ_{moy} de chaque échantillon de moelle normale (07H088 $RQ_{moy} = 1,51$; 07H139 $RQ_{moy} = 0,81$ et 07H140 $RQ_{moy} = 0,91$) et la plus faible valeur de déviation standard obtenues pour ces moelles normales ($SD_{moelles} = 0,481$). L'utilisation d'un calibrateur différent explique les valeurs différentes de surexpression de *USP42* obtenues entre les deux études pour le patient 04H120.

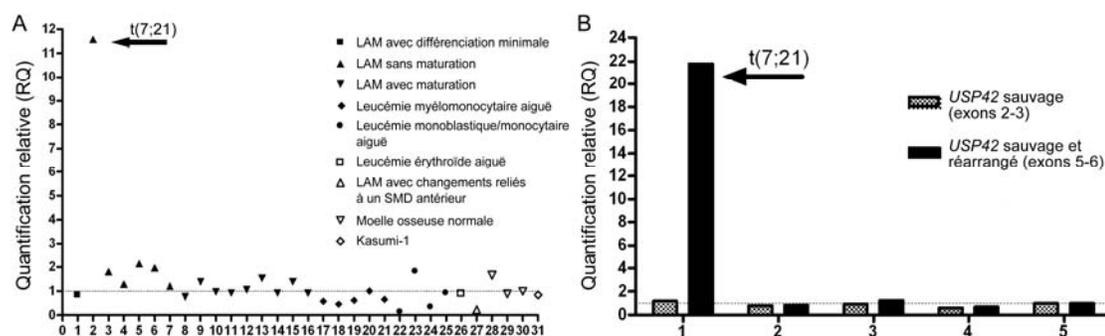


Figure 3.7. Expression du gène *USP42* dans les néoplasies hématologiques. (A) Expression de *USP42* dans 27 LAM (échantillons 1 à 27), la lignée Kasumi-1 (échantillon 31) et trois moelles normales (échantillon 28 à 30). Une surexpression de *USP42* est observée dans les cellules du patient 04H120 présentant la $t(7;21)(p22;q22)$ (échantillon 2 ; $RQ_{07H140} = 11,57$). Aucune autre surexpression ($RQ \geq 5$) n'est notée parmi les 26 autres cas de leucémies primaires évalués. Le trait pointillé indique une valeur égale à 1 faisant référence à la moelle osseuse normale 07H140 servant de calibrateur (échantillon 30). (B) Expression différentielle des allèles de *USP42* dans les

cellules primaires de patients leucémiques. Une différence de 21,7 fois supérieure de l'allèle *USP42* réarrangé (colonne foncée : amorces et sonde Taqman localisées à la jonction des exons 5 et 6 ; $RQ = 21,7$) est détectée par rapport à l'allèle sauvage (colonne pointillée : amorces et sonde Taqman localisées à la jonction des exons 2 et 3 ; $RQ = 1,2$) dans les cellules du patient 04H120 présentant la $t(7;21)(p22;q22)$ (échantillon 1). *USP42* est exprimé normalement dans les trois autres échantillons de leucémies avec caryotype normal (échantillons 2 à 4). Le trait pointillé indique une valeur égale à 1 faisant référence à la valeur moyenne des trois échantillons de moelle normale servant de calibrateur (échantillon 5).

L'expression de *USP42* et d'autres USP (*USP6* et *USP10*) a finalement été évaluée dans une cohorte plus sélective et uniforme de patients comprenant 98 échantillons de leucémies myéloïdes (Table 2.7). Une normalisation des valeurs de RQ a été réalisée par rapport à de meilleurs gènes contrôles (*HPRT* et *TBP*) et une moyenne de 4 échantillons de moelle normale a servi de calibrateur (09H007, 07H139, 07H140 et 07H088) (Annexe, tables 7.4-7.5). Ces paramètres améliorés ont permis une analyse plus fidèle de l'expression de *USP42* (et des autres gènes étudiés) dans cette nouvelle population de leucémies. L'ADNc des spécimens a été synthétisé à partir des ARN totaux, de « random primers » et de l'ensemble « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » de ABI. Les résultats de l'analyse réalisée par rapport au contrôle endogène *HPRT* sont présentés. Il est à noter que les résultats de l'analyse par rapport à *TBP* sont similaires et concordent avec les résultats obtenus avec *HPRT*.

La cohorte de 98 patients a été divisée en deux groupes de 50 et de 48 cas à des fins techniques. D'abord, un premier groupe de 50 cas a été testé incluant 6 LMMC et 44 LAM avec différents types morphologiques (avec différenciation minimale, $n = 3$; sans maturation, $n = 21$; avec maturation, $n = 7$; myélomonocytaire, $n = 3$; monoblastique/monocytaire, $n = 9$ et avec changements reliés à une myélodysplasie, $n = 1$) (Annexe, table 9.4). Encore une fois, aucune surexpression de *USP42* n'a été observée dans ces cinquante cas. Dans le second échantillonnage, 48 cas ont été évalués incluant 4 LMMC et 44 LAM avec différents types morphologiques (avec différenciation minimale, $n = 2$; sans maturation, $n = 19$; avec maturation, $n = 3$; myélomonocytaire, $n = 4$; monoblastique/monocytaire, $n = 11$; leucémie aiguë avec cellules NK « natural killer », $n = 2$ et avec changements reliés à une myélodysplasie, $n = 3$) (Annexe, table 9.5). De façon intéressante, un spécimen de LAM sans maturation (09H026) avec un caryotype normal, une mutation de *NPM1* et une duplication en tandem de *FLT3 (FLT3-ITD)* a montré une surexpression de *USP42* ($RQ_{HPRT} = 8,16$). Cette surexpression a également été observée dans l'analyse réalisée avec *TBP* ($RQ_{TBP} = 6,83$), confirmant une surexpression de *USP42* dans ces cellules.

La révision des caryotypes de ce cas n'a pas révélé de réarrangement au niveau des bras courts des chromosomes 7. De plus, une RT-PCR spécifique avec les amorces *RUNX1_ex4,5F* et *USP42_ex3R* ainsi qu'une analyse par FISH à l'aide de la sonde BAC RP11-164P11 se sont avérées négatives (Fig. 3.8). La présence d'une fusion *RUNX1-USP42* (*RUNX1* exon 5, 6 ou 7 et *USP42* exon 3 ou 4), d'une nouvelle fusion

de *USP42* avec un partenaire autre que *RUNX1* ainsi qu'une amplification génique du locus *USP42* sont donc des causes moins probables de surexpression. D'autres évènements pourraient cependant expliquer cette surexpression dont la modification du statut épigénétique de *USP42* par hypométhylation de son promoteur. Une petite délétion ciblant la partie 5' de *USP42* pourrait mener à une fusion avec le gène adjacent *EIF2AK1*, à la façon de la délétion 1p32 dans les LAL-T, et pourrait ainsi modifier l'expression de *USP42*. Enfin, la dérégulation de certains microARNs pourrait aussi contribuer à modifier l'expression de *USP42* dans ce cas. En effet, une recherche dans les bases de données (<http://www.microna.org/microna/getMrna.do?gene=84132&utr=13811&organism=9606> ; <http://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi> ; <http://www.targetscan.org/>) proposent l'existence de 27 microARNs ayant comme cible le gène *USP42* (hsa-mir-15a-b/16/195/424/497 ; hsa-mir-103/107 ; hsa-mir-144 ; hsa-mir-181a-d ; hsa-mir-27 ; hsa-mir-302a-e ; hsa-mir-520a-e ; hsa-mir-372 et hsa-mir-373).

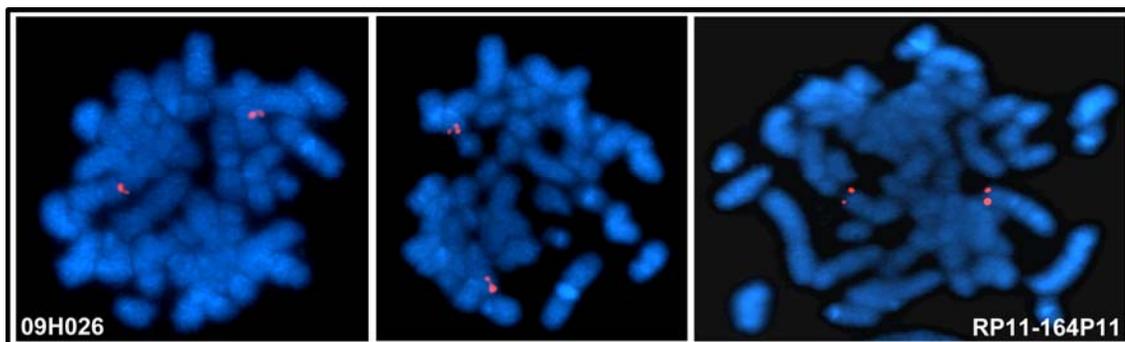


Figure 3.8. Hybridation *in situ* en fluorescence sur les chromosomes métaphasiques obtenus à partir des cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient 09H026.

Métaphases représentatives de l'hybridation avec la sonde BAC RP11-164P11 montrant deux signaux localisés sur les chromosomes 7 normaux.

En résumé, nous avons analysé par qRT-PCR un total de 173 échantillons regroupant 158 spécimens de néoplasies hématologiques variés, 6 moelles normales, 3 spécimens de sang périphérique de donneurs sains, 5 lignées cellulaires et des cellules CD34⁺ purifiées à partir de moelle osseuse normale. Sur l'ensemble des 173 cas étudiés, seuls deux échantillons de patients leucémiques (04H120 et 09H026) présentaient une surexpression de *USP42*. Ces cas maintiennent une surexpression supérieure à 5, peu importe le calibrateur utilisé ou le contrôle endogène servant à la normalisation, suggérant de réelles surexpressions de *USP42* dans ces deux cas. Neuf des spécimens évalués montraient plutôt une réduction de l'expression de *USP42* de deux fois (RQ < 0,5) et ce, indépendamment du contrôle utilisé (Table 3.2), suggérant une délétion possible d'un allèle, une hyperméthylation du promoteur ou la présence de mutations affectant l'expression de *USP42* chez ces patients.

BCLQ	Dx	RQ (HPRT)	RQ (GAPDH)	RQ (TBP)	RQ (18S)	Caryotype
05H034	LAM sans maturation	0,370		0,491		47,XY,del(5)(q?31),+mar[21]
05H050	LAM myélomonocytaire	0,430		0,493		46,XY[20]
07H122	Leucémie à cellules NK	0,499		0,428		49,XX,+6,+10,+19,i(21)(q10)[2]
07H160	LAM sans maturation	0,417		0,318		45,XX,-7[19]/46,XX[1]
08H036	LAM sans maturation	0,317		0,280		Absence de métaphase
08H049	Leucémie monocytaire/monoblastique aiguë	0,412		0,499		46,XY[18]
08H065	LAM sans maturation	0,295		0,161		46,XY,add(7)(q36)[6]/46,XY[14]
02H033	Leucémie monocytaire/monoblastique aiguë		0,137		0,291	47,XY,+8[17]/49,XY,+6,+8,+8[2]/ 46,XY[2]
02H043	LAM sans maturation		0,100		0,443	46,XX,del(11)(p12)[22]

Table 3.2. Sous-expression du gène *USP42* dans les néoplasies hématologiques. Le diagnostic morphologique selon le WHO (Dx) et le caryotype des neuf patients atteints de différents types de leucémie myéloïde aiguë (LAM) montrant une diminution de l'expression de *USP42* de plus de deux fois ($RQ \leq 0,5$) sont indiqués. Les valeurs de quantification relative (RQ) sont notées par rapport aux contrôles évalués, *HPRT* et *TBP* ou *GAPDH* et *ARN 18S*. NK, cellules « natural killer ».

3.6.3 Analyse différentielle de l'expression de l'allèle *USP42* sauvage et de l'allèle *USP42* réarrangé

Afin d'évaluer l'expression différentielle des deux allèles de *USP42* chez le patient 04H120 (sauvage et réarrangé), nous avons utilisé deux essais TaqMan® ciblant la jonction des exons 2 et 3 (IR2167 ; allèle *USP42* sauvage) et la jonction des exons 5 et 6 de *USP42* (IR0327 ; allèle *USP42* réarrangé et allèle sauvage). Puisque la translocation engendre une dissociation des exons 2 et 3 de *USP42*, seul l'allèle sauvage sera amplifié avec l'essai ciblant cette jonction. Cette stratégie nous a donc permis de distinguer lequel des allèles contribuait à la surexpression de *USP42* détectée chez le patient 04H120. L'ARN total extrait de sept spécimens (LAM présentant la t(7;21)(p22;q22), $n = 1$; LAM avec un caryotype normal, $n = 3$; moelles normales, $n = 3$), des « random primers » et l'ensemble « High Capacity reverse transcription » de ABI ont été utilisés afin de synthétiser les ADNc (Annexe, table 9.3). Trois contrôles endogènes (*GAPDH*, *TBP* et *HPRT*) ont été évalués et le gène *HPRT* a été sélectionné pour l'analyse finale. Une moyenne des trois moelles normales a servi de calibrateur ($SD_{\text{moy}} = 0,17$ pour les deux essais ciblant *USP42*) (Table 2.7).

L'analyse finale a montré une surexpression de l'allèle *USP42* réarrangé dans les cellules du patient 04H120 présentant la $t(7;21)(p22;q22)$ (RQ = 21,77) par rapport à l'allèle *USP42* sauvage (RQ = 1,20) (Fig. 3.7B). Pour les trois autres échantillons de LAM étudiés, des valeurs proches de la normale d'expression (RQ = 1) et comparables entre les deux essais ont été obtenues. Suivant cette translocation, les séquences de *USP42* sont fusionnées à la région codante de *RUNX1* et sont soumises au contrôle de son promoteur, ce qui explique probablement la surexpression de l'allèle réarrangé dans ces cellules.

3.7 Étude de la localisation cellulaire des chimères de fusion *RUNX1-USP42* par immunofluorescence

Afin d'étudier l'expression des protéines chimériques *RUNX1-USP42* prédites et de déterminer leur localisation cellulaire, des études en immunofluorescence ont été réalisées à l'aide d'un anticorps reconnaissant la région proximale au domaine RHD de *RUNX1* (Table 2.10). Une étude par Western blot a aussi été effectuée (voir section 3.8). L'expression des exons 1 à 5 et l'absence de mutation au sein de ces exons des allèles de *RUNX1* et de *RUNX1-USP42* nous ont permis de cibler cette région en N-terminale de la protéine avec confiance. Les immunofluorescences ont été effectuées sur les cellules primaires du patient présentant la $t(7;21)(p22;q22)$ et sur les cellules des

lignées de leucémie aiguë incluant la lignée de LAL-B REH exprimant la fusion *ETV6-RUNX1* et la lignée de LAM Kasumi-1 exprimant la fusion *RUNX1-RUNX1T1*.

Les analyses par microscopie en déconvolution nous ont permis de confirmer le profil d'expression nucléaire décrit pour *RUNX1* et pour *RUNX1-RUNX1T1* dans la lignée Kasumi-1 (Fig. 3.9A) (McNeil et al., 1999; Barseguian et al., 2002). Nous avons également observé un profil d'expression nucléaire et cytoplasmique dans les cellules de la lignée REH, suggérant une expression nucléaire de *RUNX1* sauvage et une expression cytoplasmique de la chimère *ETV6-RUNX1* (Fig. 3.9A) (Rho et al., 2002). Dans les cellules primaires exprimant la fusion *RUNX1-USP42*, un profil d'expression majoritairement nucléaire a été révélé par l'anticorps *RUNX1*, suggérant une localisation nucléaire des protéines *RUNX1* sauvages et des chimères *RUNX1-USP42* présumées (Fig 3.9A). Toutefois, il est également possible que l'anticorps ne détecte que la protéine sauvage, expliquant un marquage majoritairement nucléaire. En raison du rapport nucléo-cytoplasmique élevé des cellules leucémiques avec $t(7;21)(p22;q22)$, un léger marquage cytoplasmique n'est pas exclu (Fig. 3.9B).

Afin de confirmer ces résultats, d'autres expériences seront nécessaires. Par exemple, une double immunofluorescence avec un marqueur spécifique du cytoplasme (α -tubuline) et/ou un Western blot avec fractionnement des protéines cytoplasmiques et nucléaires, suivi d'une révélation de la protéine d'intérêt dans les fractions séparées, pourraient nous permettre de confirmer la localisation du signal. Par ailleurs, puisque

l'anticorps utilisé détecte à la fois la protéine RUNX1 sauvage et de possibles chimères, la fusion *RUNX1-USP42* pourrait aussi être clonée dans un vecteur portant un « tag », lequel serait ensuite transfecté dans une lignée cellulaire et révélé par un anticorps spécifique anti-tag. Cette expérience rend possible l'expression d'une chimère marquée d'un « tag » en position N- ou C-terminale et nous permettrait de cibler précisément la protéine anormale RUNX1-USP42 et d'évaluer l'expression de la protéine chimérique uniquement.

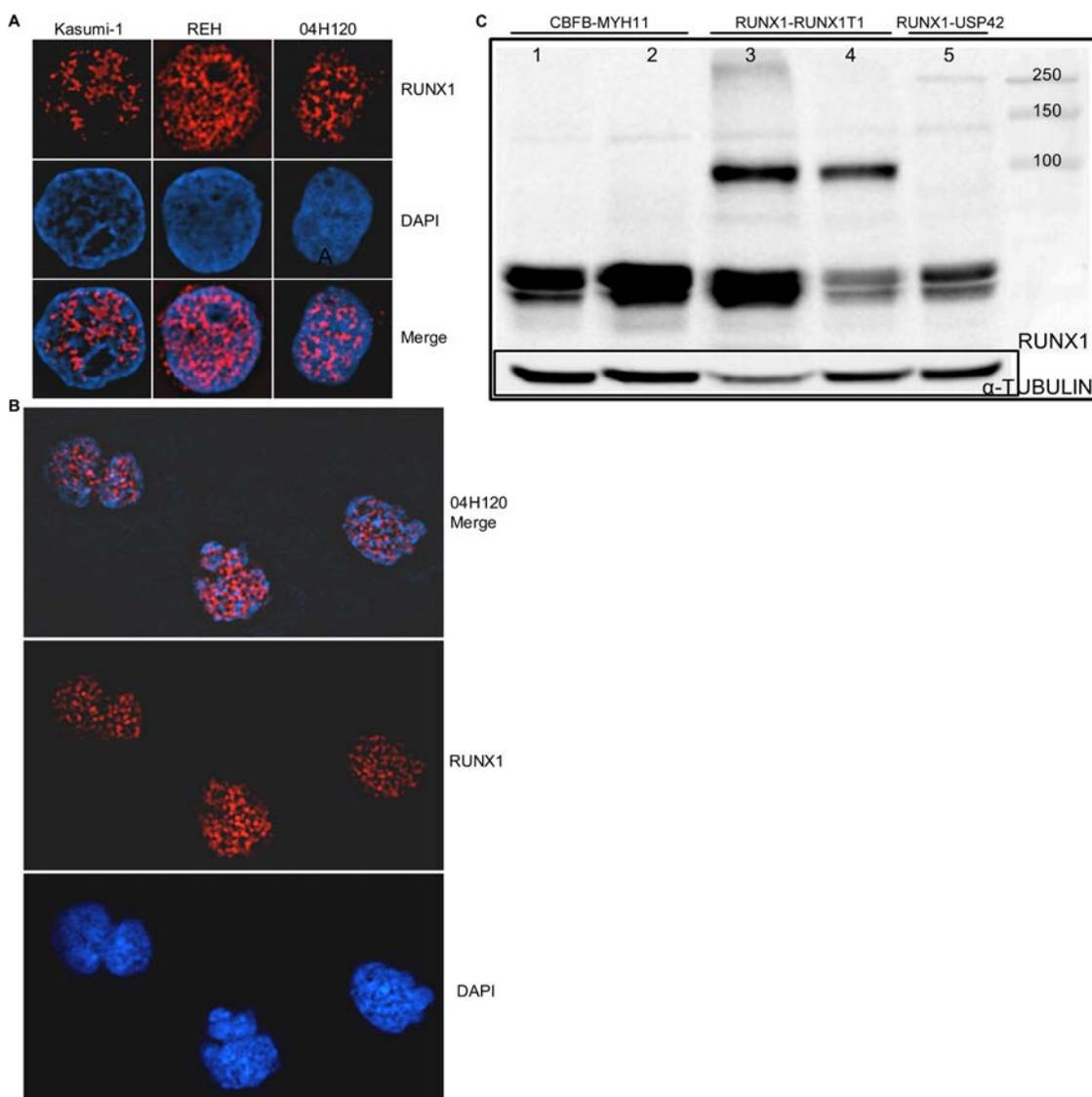


Figure 3.9. Profil d'expression de la région N-terminale de RUNX1 dans les cellules primaires de patients leucémiques et/ou dans les lignées leucémiques. (A) Profil d'expression de l'anticorps contre RUNX1 dans les cellules des lignées leucémiques Kasumi-1 (fusion RUNX1-RUNX1T1) et REH (fusion ETV6-RUNX1) et dans les cellules primaires du patient 04H120 présentant la t(7;21)(p22;q22) et exprimant possiblement la chimère RUNX1-USP42. Une expression majoritairement nucléaire est visualisée dans les cellules leucémiques du patient 04H120. (B) Image représentative des cellules primaires du patient 04H120. (C) Profil d'expression de l'anticorps contre

RUNX1 par Western Blot, dans les cellules de patients atteints de LAM avec inv(16)(p13q22) (puits 1-2), t(8;21)(p22;q22) (puits 3-4) ou t(7;21)(p22;q22) (puit 5). RUNX1 sauvage s'exprime à environ 55 kDa dans chaque spécimen étudié. Une bande, bien visualisée à 95 kDa, représente la chimère RUNX1-RUNX1T1. Une bande visualisée à environ 250 kDa est détectée uniquement dans les cellules avec la t(7;21)(p22;q22). L'alpha-tubuline (α -tubuline) sert de marqueur de charge protéique pour chaque puit.

Les images obtenues en déconvolution suggèrent des similitudes entre les profils d'expression de RUNX1 dans la lignée Kasumi-1 et dans les cellules primaires du patient 04H120. On remarque d'abord, dans ces deux types cellulaires, une distribution ponctuée du signal en foci nucléaires tel que décrit pour la protéine RUNX1 sauvage (McNeil et al., 1999). On note aussi un marquage plus intense au sein des régions d'ADN de coloration légère au DAPI, soit au niveau des régions où les molécules d'ADN sont décondensées et activement transcrites (euchromatine). Il est important de souligner que l'anticorps utilisé détecte la protéine sauvage et possiblement aussi la protéine chimérique, pouvant expliquer une association possible avec l'euchromatine. En effet, RUNX1 sauvage colocalise dans des foci nucléaires avec certains marqueurs de l'activation transcriptionnelle dont l'ARN polymérase II (Zeng et al., 1998). De même, la fusion RUNX1-RUNX1T1 est aussi reconnue comme un facteur de transcription aberrant capable d'activer ou de réprimer le réseau transcriptionnel de RUNX1. Afin de confirmer une co-localisation des protéines RUNX1 avec l'euchromatine, des expériences complémentaires seraient également requises. Par exemple, une double immunofluorescence avec des marqueurs de la transcription active (anticorps contre la

méthylation de la lysine 4 ou 79 de l'histone 3 [H3K4 et H3K79], anticorps contre l'ARN polymérase II) pourrait aider à confirmer cette hypothèse.

3.8 Étude d'expression de la protéine de fusion RUNX1-USP42 par Western Blot

Parallèlement aux expériences d'immunofluorescence, nous avons vérifié l'expression des protéines chimériques RUNX1-USP42 par Western blot dans les cellules primaires du patient avec la t(7;21)(p22;q22). Tel que suggéré par le séquençage, les transcrits *RUNX1-USP42* respectent le cadre de lecture et peuvent mener à l'expression présumée de deux protéines chimériques de fusion différant l'une de l'autre par l'expression de 64 acides aminés (7 kDa) codés par l'exon 6 de *RUNX1*.

Les protéines totales de cinq spécimens de leucémie aiguë présentant soit la t(7;21)(p22;q22)/fusion *RUNX1-USP42* ($n = 1$), une t(8;21)(p22;q22)/fusion *RUNX1-RUNX1T1* ($n = 2$) ou une inv(16)(p13.1q22)/fusion *CBFB-MYH11* ($n = 2$) ont été extraites. Afin de s'assurer que l'anticorps contre RUNX1 (Cell Signaling) reconnaît la portion N-terminale et qu'il détecte la protéine RUNX1 sauvage et les protéines chimériques telles RUNX1-RUNX1T1 (poids de 95 kDa) et RUNX1-USP42, nous avons étudié des spécimens de LAM exprimant la fusion RUNX1-RUNX1T1 (Licht 2001) et des spécimens exprimant la fusion CBFB-MYH11 comme contrôle positif et négatif respectivement. Malgré des charges non-équivalentes entre chaque échantillon,

une bande de 95 kDa s'exprime fortement et uniquement dans les deux spécimens avec t(8;21)(q22;q22) servant de contrôle positif (Fig. 3.9C, puits 1-2, 5), confirmant la capacité de cet anticorps à détecter la chimère RUNX1-RUNX1T1 et donc aussi possiblement la fusion RUNX1-USP42.

Pour chacun des spécimens primaires étudiés, nous avons observé des bandes à un poids approximatif de 55 kDa, représentant la protéine RUNX1 sauvage et ses différentes isoformes ayant subi des modifications post-traductionnelles (poids de la protéine sauvage : 55 kDa) (Fig 3.9C). Tel que mentionné dans l'introduction, RUNX1 est fortement régulé et subit de multiples modifications post-traductionnelles incluant l'acétylation (40 daltons par groupement acétyle), la phosphorylation (80 daltons par groupement phosphate) et l'ubiquitination (7~8,5 kDa par molécule d'ubiquitine), expliquant le poids supérieur de certaines bandes (Bae and Lee 2006). De plus, une bande identifiée à un poids approximatif de 130 kDa a été détectée chez tous les patients, représentant possiblement un produit non-spécifique révélé par l'anticorps (Fig. 3.9C).

Un poids théorique de 171 kDa et 164 kDa a été calculé à l'aide d'outils de protéomique (http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html, http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html et <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>) pour les deux chimères de fusion présumées traduites d'après les transcrits T1 et T2 respectivement. À l'exception d'une

faible bande d'un poids approximatif de 240 kDa, aucune autre bande n'a été identifiée dans les cellules du patient avec la t(7;21)(p22;q22) au poids attendu, et ce, lors des deux expériences indépendantes réalisées (Fig. 3.9C, puit 5). Cette bande absente dans les autres spécimens sans translocation pourrait représenter les protéines chimériques prédites. Or, une différence d'environ 70 kDa est observée entre le poids détecté et le poids prédit, laquelle pourrait s'expliquer par l'ajout de modifications post-traductionnelles, tel que proposé pour la protéine sauvage. Cependant, cette bande est très faible et similaire à la bande non-spécifique de 130 kDa soulevant la possibilité que cette bande puisse aussi être non-spécifique. Un marquage avec un anticorps spécifique contre la protéine USP42 pourrait nous aider à clarifier cette hypothèse. Pour ce faire, nous avons initié une étude de validation du seul anticorps disponible commercialement au moment de cette investigation. Une technique d'ARN interférence a cependant suggéré l'incapacité de l'anticorps utilisé à reconnaître spécifiquement la protéine USP42. En effet, aucune diminution de l'expression protéique n'a été détectée dans les cellules exprimant les ARN interférence de type shRNA (Sigma, Mission). Les expériences protéiques ciblant USP42 n'ont donc pas été davantage explorées.

3.9 Mécanismes de leucémogénèse proposés pour la fusion

RUNX1-USP42

Les gènes codant pour des enzymes de déubiquitination de la famille des USP représentent une nouvelle classe de partenaires de *RUNX1*. Les USP ne partagent pas les

caractéristiques normalement retrouvées chez les partenaires plus classiques et récurrents de RUNX1 (ETV6, RUNX1T1 et MECOM). Ces enzymes ne possèdent pas de domaines de liaison à l'ADN, de domaines répresseurs ou de domaines de dimérisation lesquels sont impliqués dans la leucémogénèse des fusions RUNX1-RUNX1T1, ETV6-RUNX1 et RUNX1-MECOM. Toutefois, les USP possèdent, via leurs domaines USP, la capacité d'interagir avec de multiples protéines et peuvent réaliser des modifications post-traductionnelles de leurs substrats.

Basé sur nos analyses de séquençage, des protéines chimériques de fusion RUNX1-USP42 sont attendues. Ces chimères présumées conservent le domaine RHD de liaison à l'ADN, le domaine d'activation transcriptionnelle TE3 de RUNX1 et le domaine catalytique USP de USP42, leur permettant potentiellement de lier les séquences consensus de RUNX1 au niveau de ses gènes cibles, de s'hétérodimériser avec CFBF et finalement de réaliser de multiples interactions protéiques avec les substrats de USP42. À ce jour, les substrats et fonctions de USP42 sont majoritairement inconnus, limitant les interprétations quant aux mécanismes oncogéniques possibles de cette fusion. Puisque le domaine TAD/ID de RUNX1 est dissocié dans les chimères RUNX1-USP42, une activité transcriptionnelle aberrante est possible. Toutefois, aucune protéine de fusion n'a été observée par Western blot au poids théorique calculé dans les cellules du patient avec t(7;21)(p22;q22). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'aucune protéine de fusion ne soit traduite sur le plan protéique ou que les chimères soient rapidement dégradées par ubiquitination ou grandement instable menant à la perte rapide

d'expression. Ces études préliminaires en Western blot ont cependant révélé une bande à 240 kDa ne nous permettant pas d'exclure l'hypothèse que des chimères soient exprimées vu l'existence de plusieurs isoformes de tailles variables décrites par l'équipe de Hock et collaborateurs. Puisque cette bande n'a pas été séquencée par spectrométrie de masse et qu'elle n'a pas été confirmée à l'aide d'un anticorps spécifique contre USP42, il faut également considérer la possibilité que seul RUNX1 sauvage soit détecté dans les cellules présentant la t(7;21)(p22;q22) dans les études d'immunofluorescence.

La surexpression de l'allèle réarrangé de *USP42* a été confirmée dans les cellules présentant la t(7;21)(p22;q22) et pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de cette leucémie. D'autres enzymes de déubiquitination sont également surexprimées dans les certains cancers et tumeurs. Par exemple, le gène *USP6* (bande 17p13.2) a été identifié au sein de diverses translocations chromosomiques associées à des kystes anévrismaux de l'os et à d'autres lésions similaires des os (Oliveira et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Panagopoulos et al., 2008). La juxtaposition de multiples promoteurs devant les séquences codantes de *USP6* mène à l'augmentation de son expression dans ces maladies. *USP6* a été identifié comme un oncogène potentiel dans un modèle de xénotransplantation (Ye et al., 2010) et représente maintenant une composante majeure de l'étiologie de ces tumeurs. Parmi les USP étudiées par qRT-PCR au sein de la cohorte de 98 spécimens de leucémies myéloïdes (Tables 2.7 ; annexe, tables 9.5-9.6), les niveaux d'expression de *USP6* ont été évalués, révélant une surexpression notable de

USP6 dans dix échantillons. Ces résultats ont aussi été validés par RT-PCR (Fig. 3.10 et table 3.3).

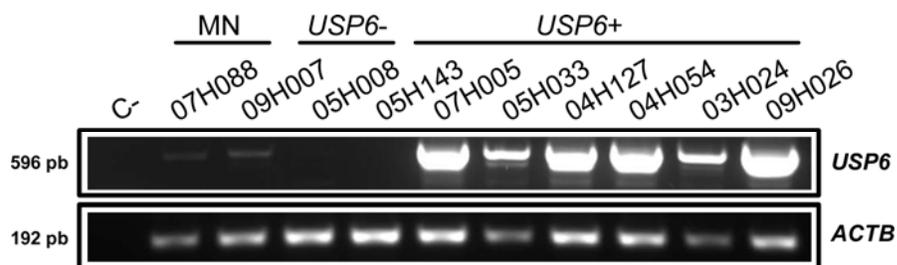


Figure 3.10. Expression de *USP6* par RT-PCR dans les cellules primaires de deux moelles osseuses normales et de huit patients leucémiques sans ou avec surexpression du gène. Les patients avec surexpression démontrent clairement une activation transcriptionnelle de *USP6* (596 pb) par rapport aux patients 05H008 et 05H143 lesquels n'exprimaient pas le gène. La bêta-actine (*ACTB*) a servi de contrôle interne de la PCR.

BCLQ	Dx	Caryotype	RQ (<i>HPRT</i>)	RQ (<i>TBP</i>)
03H024	LAM avec différenciation minimale	47,XY,+8[18]/48,XY,+8,+8[3]/46,XY[1]	161,38	110,75
03H049	Leucémie myélomonocytaire aiguë	46,XX[20]	31,33	48,88
04H054	LAM avec maturation	46,XY,add(1)(q44),der(2)?add(2)(p11.2),der(2)?add(2)(q21),add(3)(q13),add(5)(p15),t(6;9)(p23;q34),del(17)(q23),add(19)(q13.4),del(20)(q12),+mar1[cp21]	125,09	105,50
04H127	LAM avec différenciation minimale	42~50,XX,-3,del(5)(q13q33),del(7)(q22),-8,add(10)(p11.2),-10,-11,del(11)(q23),add(12)(p11.2),+?13,-16,-17,-20,-21,-22,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,+mar7,+mar8,+mar9,+mar10[cp19]	77,85	119,38
05H033	LAM avec maturation	46,XY[22]	75,72	85,30
05H120	Leucémie myélomonocytaire chronique	46,XX[22]	34,90	35,62
05H192	LAM sans maturation	46,XY[18]	10,70	13,78
07H005	LAM avec changements reliés à un SMD	46,XX[22]	59,23	136,65
09H026	LAM avec différenciation minimale	46,XY[20]	347,14	290,69
09H058	LAM avec maturation	46,XX[20]	27,29	29,74

Table 3.3. Surexpression du gène *USP6* dans les leucémies myéloïdes de l'adulte (LAM). Le diagnostic selon les critères de classification du « World Health Organization » (Dx) et le caryotype des dix patients montrant une surexpression de *USP6* ($RQ \geq 5$). Les valeurs de quantification relative (RQ) sont notées par rapport aux deux contrôles *HPRT* et *TBP*.

La surexpression de *USP42* et de *USP6* observée dans cette étude est particulièrement intéressante. En effet, le site catalytique des enzymes est une cible potentielle pour de petites molécules chimiques inhibitrices. Tel que démontré par le succès de l'Imatinib mesylate (Gleevec) dans les LMC, des thérapies ciblées contre les USP pourrait être envisagées. La surexpression de différentes USP dans les tumeurs et cancers nous

permet de proposer un rôle potentiel joué par ces enzymes dans le développement de ces maladies. Or, ceci demeure à être confirmé sur le plan fonctionnel.

CHAPITRE 4

4. Étude de la t(1;21)(p22;q22)

4.1 Paramètres cliniques du cas 07-0893

En décembre 2005, les échantillons de sang périphérique et de moelle osseuse d'un patient de 62 ans de sexe masculin ont été reçus à la BCLQ pour un diagnostic possible de leucémie. Une formule sanguine a démontré un décompte plaquettaire normal ($322 \times 10^9/L$), de l'anémie (85 g/L), un décompte de leucocytes très élevé de $105,6 \times 10^9/L$ et la présence de 53 % de cellules blastiques d'allure myéloïde au frottis. Une analyse morphologique de l'aspirat médullaire a révélé la présence de mégacaryocytes dysplasiques et de 58 % de blastes positifs pour la myéloperoxidase (MPO). Les blastes du sang périphérique et de la moelle osseuse exprimaient les marqueurs CD117, CD38, CD33, CD7 et étaient négatifs pour les antigènes HLA-DR, CD34 et CD13 en cytométrie de flux. Un diagnostic de LAM avec maturation a été posé selon la classification du WHO (FAB : LAM M2). L'analyse caryotypique des cellules au diagnostic a révélé la présence d'une monosomie 7 dans 17 cellules sur 20 analysées (46,XY,-7[17]/46,XY[3]).

Le patient a été traité, en décembre 2005, avec un régime de chimiothérapie d'induction composé de 7 jours de cytarabine en infusion et de 3 jours d'idarubicine (inhibiteur de la TOP2). En février 2006, un premier cycle de consolidation incluant six doses de

cytarabine a été compliqué d'une pneumonie, d'un herpès simplex et d'une septicémie à streptocoque *mitis*. Le patient a reçu, en mai 2006, un second cycle de consolidation. En raison d'une monosomie 7 présente au caryotype, une greffe de type allogénique lui a été proposée. En raison de son âge avancé, le patient a reçu, en août 2006, un régime de conditionnement pré-greffe d'intensité réduite composé de busulfan (agent alkylant) et de fludarabine puis a reçu une allogreffe avec un donneur apparenté de sexe féminin. La greffe s'est compliquée d'une maladie du greffon contre l'hôte hépatique et cutanée, en janvier 2007.

Un médullogramme, réalisé en avril 2007, a révélé la présence d'une blastose à 10 %. Dès août 2007, une progression rapide a été constatée, avec un décompte de leucocytes à $16,4 \times 10^9/L$, de l'anémie (86 g/L), une thrombopénie ($34 \times 10^9/L$) et une blastose à 30 % au frottis sanguin. Le médullogramme de contrôle a montré une nette diminution des mégacaryocytes et une blastose à 52 % d'allure myéloïde. En cytochimie, la population blastique était positive pour la MPO et pour le noir soudan. L'immunophénotype de cette population a montré une positivité pour les marqueurs HLA-DR, CD117, CD34, CD33 et CD13. Le marqueur CD7 était cependant négatif (CD38 non fait). L'analyse cytogénétique de ces cellules a révélé la présence d'une $t(1;21)(p22;q22)$ dans les 26 métaphases analysées (Fig. 4.1A). La duplication en tandem du gène *FLT3* (*FLT3-ITD*) a été recherchée dans les cellules de cette seconde maladie et rétrospectivement dans les cellules au diagnostic et s'est avérée négative dans les deux cas. Le diagnostic de LAM en rechute post-greffe sera révisé, à la lumière des analyses cytogénétiques (voir section

4.4), pour une leucémie secondaire à la chimiothérapie (t-LAM). Le patient recevra un traitement à visée palliative et décédera en septembre 2007.

La t(1;21)(p22;q22) a été rapportée dans un seul autre cas de leucémie secondaire à la chimiothérapie (t-LAM M2) reliée à des inhibiteurs de la TOP2 (Nadal et al., 2008). Toutefois, le gène partenaire de *RUNXI* n'a pas été identifié dans cette étude. Puisqu'une translocation similaire a été détectée chez notre patient, une investigation par la technique de FISH a été effectuée au laboratoire de cytogénétique clinique à l'aide de la sonde RUNX1-RUNX1T1. L'analyse a confirmé un réarrangement de *RUNXI* au sein de cette anomalie. Afin de déterminer le point de cassure exact au niveau de *RUNXI*, nous avons alors initié une caractérisation moléculaire de cette nouvelle translocation.

4.2 Analyse cytogénétique

4.2.1 Identification du point de cassure sur le gène *RUNXI*

La caractérisation du point de cassure sur le gène *RUNXI* a été réalisée à l'aide de la technique de FISH avec des sondes BACs couvrant différents exons de *RUNXI*. Suite à la t(1;21)(p22;q22), la région 5' de *RUNXI* est transloquée sur le chromosome dérivé 1 [der(1)] tandis que la région en 3' demeure sur le chromosome dérivé 21 [der(21)]. À l'aide des BACs RP11-299D9 (139 kb, couvrant l'intron 1b et les exons 2 à 8 de *RUNXI*) et RP11-17O20 (142 kb, couvrant une région en position 5' à *RUNXI*, les

exons 1a-1b et les introns 1a-1b du gène), la région de cassure sur le gène *RUNXI* a été circonscrite. L'hybridation de la sonde RP11-299D9 a révélé la présence de trois signaux situés sur le chromosome 21 normal, sur le der(21) et sur le der(1), suggérant une cassure localisée à l'intérieur de la région couverte par cette sonde (Fig. 4.1B). Afin de confirmer ce résultat, une hybridation de la sonde RP11-17O20 a été effectuée sur les chromosomes métaphasiques. Deux signaux ont respectivement été observés sur le chromosome 21 normal et sur le der(1), confirmant une cassure en position centromérique (Fig. 4.1C). À l'aide de ces profils d'hybridation, il nous a été possible de confirmer le réarrangement de *RUNXI* au sein de cette nouvelle t(1;21)(p22;q22). Ainsi, une cassure localisée au niveau du BCR de *RUNXI* (exons 5 à 7) a été proposée.

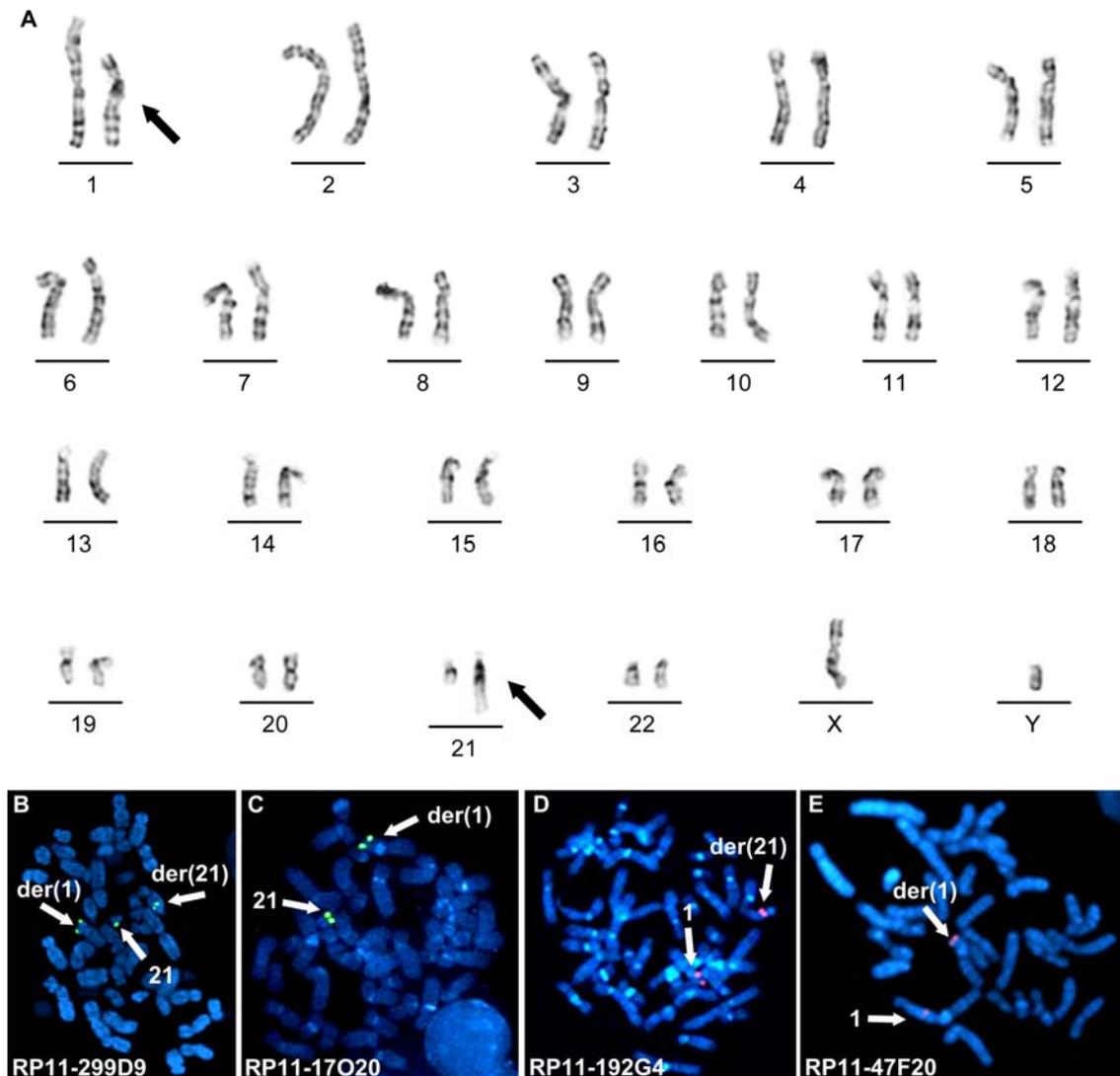


Figure 4.1. Analyse cytogénétique des cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient atteint de leucémie myéloïde aiguë secondaire à une chimiothérapie antérieure (t-LAM) présentant la $t(1;21)(p22;q22)$. (A) Caryotype standard en bandes G des cellules de la t-LAM avec $t(1;21)(p22;q22)$. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés 1 [der(1)] et dérivés 21 [der(21)]. (B) Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur des chromosomes métaphasiques avec la sonde RP11-299D9, couvrant les exons 2 à 8 de *RUNX1*. Un signal normal est détecté sur le chromosome 21 normal et un signal divisé est visualisé sur les deux chromosomes anormaux der(1) et der(21). (C) FISH sur des chromosomes métaphasiques avec la sonde RP11-17020, (D) FISH sur des chromosomes métaphasiques avec la sonde RP11-192G4, (E) FISH sur des chromosomes métaphasiques avec la sonde RP11-47F20.

couvrant la partie 5', l'exon 1 et l'intron 1 de *RUNXI*. Deux signaux sont visualisés sur le chromosome 21 normal et sur le der(1), suggérant un point de cassure en position centromérique. (D) FISH sur des chromosomes métaphasiques avec la sonde RP11-192G4, couvrant la région 5' du gène *COL24A1*. Un signal est localisé sur le chromosome 1 normal tandis qu'un second signal est détecté sur le der(21), suggérant un point de cassure en position centromérique à la sonde utilisée. (E) FISH sur des chromosomes métaphasiques avec la sonde RP11-47F20, couvrant la région 5' du gène *ODF2L* et les gènes *CLCA2* et *CLCA1*. Deux signaux sont visualisés sur le chromosome 1 normal et sur le der(1), suggérant un point de cassure télomérique à cette sonde.

4.2.2 Identification du gène partenaire de la t(1;21)(p22;q22) : *CLCA2*

L'analyse des caryotypes standards en bande G nous a permis de débiter notre investigation en ciblant le bras court du chromosome 1 et plus spécifiquement, la région chromosomique 1p22-1p31.1. La bande chromosomique 1p22, laquelle se subdivise en trois sous-bandes (1p22.1, 1p22.2 et 1p22.3), est une région particulièrement riche en gènes. En utilisant une stratégie de marche sur le chromosome, nous avons ciblé certains gènes candidats localisés à la bande chromosomique 1p22.3. L'hybridation des sondes RP11-192G4, RP11-775P20 et RP11-47F20 sur les chromosomes métaphasiques du patient 07-0893 nous a permis de délimiter la région de cassure au niveau de cette bande chromosomique. L'hybridation de la sonde RP11-192G4 (171 kb) a généré deux signaux localisés sur le chromosome 1 normal et sur le der(21), suggérant un point de cassure situé en position centromérique à la région couverte par cette sonde (Fig. 4.1D). En position centromérique à cette sonde, les BACs RP11-47F20 (157 kb) et RP11-775P20

(183 kb) de la bande chromosomique 1p22.3 ont été sélectionnés afin de poursuivre notre étude. L'hybridation de ces deux BACs a révélé la même information, soit la présence de deux signaux respectivement localisés sur le chromosome 1 normal et sur le der(1), suggérant donc un point de cassure en position télomérique à la région couverte par ces sondes (Fig. 4.1E). Basé sur ces profils d'hybridation, une région de moins de 150 kb séparant les deux BACs RP11-192G4 et RP11-775P20/RP11-47F20 a été étudiée (Fig. 4.2A).

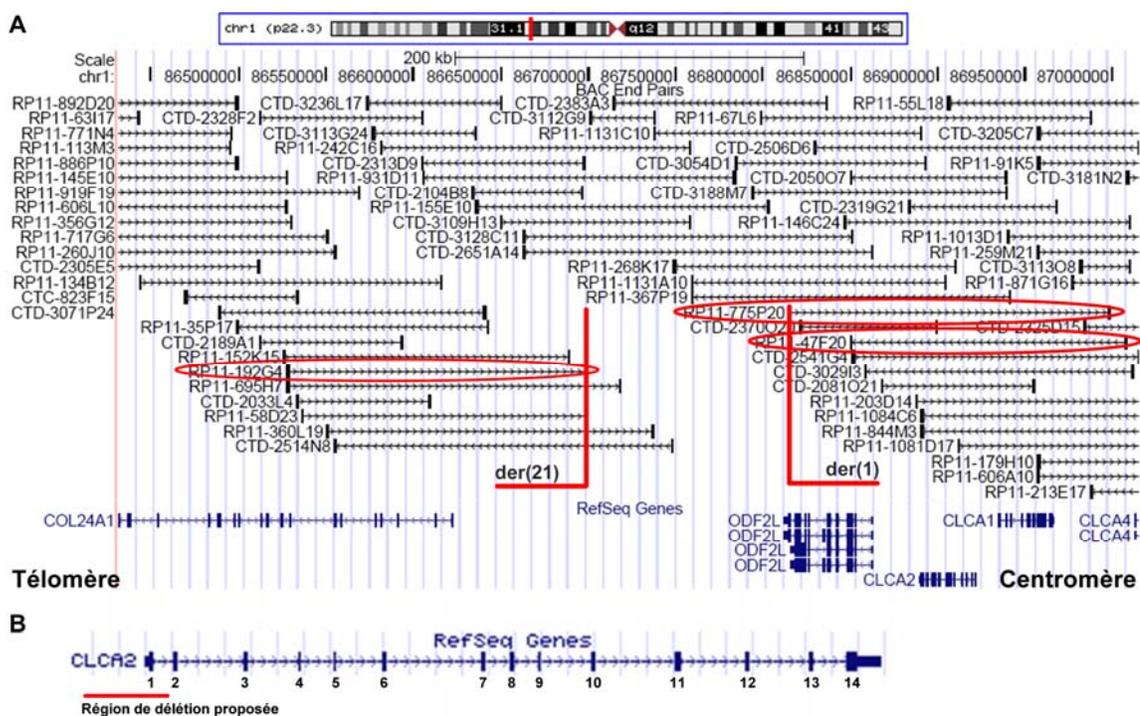


Figure 4.2. Position des BACs ciblant la bande chromosomique 1p22.3. (A) Les BACs RP11-192G4 et RP11-775P20/RP11-47F20 sont encadrés en rouge. Une région d'environ 150 kb, délimitée par ces BACs, peut être déterminée à l'aide de l'échelle de 200 kb représentée sur le haut de la figure. Les quatre gènes candidats couverts par ces trois sondes sont indiqués au bas de la figure. Le gène *COL24A1* est en position

télomérique tandis que le gène *CLCA1* est en position centromérique. Der(21), chromosome dérivé 21 ; der(1), chromosome dérivé 1. Figure tirée et modifiée du site « USCS genome browser », <http://genome.ucsc.edu/>. (B) Représentation schématique du gène *CLCA2*, comptant 14 exons. La région de délétion proposée, ciblant la région 5', l'exon 1 et l'intron 1 de *CLCA2*, est indiquée par un trait rouge.

Dû à la basse résolution de la technique de FISH, un petit signal généré par l'une ou l'autre des sondes BACs couvrant cette région d'intérêt aurait pu être manqué. Nous avons donc élargi notre région d'investigation à environ 500 kb et avons retenu quatre gènes candidats de la bande 1p22.3 dont *COL24A1*, *ODF2L*, *CLCA2* et *CLCA1* (Fig. 4.2A). De ces quatre gènes, seuls *CLCA2* et *CLCA1* possédaient une orientation télomère vers centromère identique à *RUNXI*, permettant la formation et l'expression d'un possible gène de fusion. Une approche par RT-PCR a ensuite été priorisée afin d'identifier le nouveau partenaire de fusion de *RUNXI* à la bande 1p22.3.

Une revue de la littérature sur les gènes *CLCA1* et *CLCA2* « chloride channel accessory 2 » a révélé une fonction possible de gène suppresseur de tumeur pour *CLCA2* dans le cancer du sein (Gruber and Pauli 1999; Elble and Pauli 2001; Walia et al., 2009). Une hyperméthylation du promoteur de *CLCA2* (Li et al., 2004) et de fréquentes délétions de ce locus (Balakrishnan et al., 2006) ont respectivement été rapportées dans des lignées cellulaires de cancer du sein et dans le lymphome du manteau. Puisque *CLCA2* était le gène le plus central à la région d'investigation, il a alors été sélectionné comme candidat.

4.3 Identification des transcrits de fusion *RUNX1-CLCA2* et *CLCA2-RUNX1*

4.3.1 Analyse des transcrits de la fusion principale *RUNX1-CLCA2*

Des RT-PCR ont été réalisées sur l'ARN total extrait à partir des cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient présentant la t(1;21)(p22;q22) à l'aide de l'ensemble « One step RT-PCR kit » de Qiagen et du couple d'amorces RUNX1_ex4,5F et CLCA2_ex7R. Les conditions d'amplification suivantes ont été utilisées : 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 60°C pendant 45 secondes et d'extension à 72°C pendant une minute.

Au moins trois bandes majeures d'amplification ont été visualisées lors de la migration du produit de PCR sur un gel d'agarose de 1,5 % (Fig. 4.3A). Le séquençage de la bande prédominante (T1, 1230 pb) a révélé la présence d'une fusion entre l'exon 6 de *RUNX1* et l'exon 2 de *CLCA2* (Figs. 4.3B-4.3C). Afin de confirmer la spécificité de ce produit, nous avons utilisé un second couple d'amorces respectivement localisé dans l'exon 6 de *RUNX1* (RUNX1_ex6F) et dans l'exon 2 de *CLCA2* (CLCA2_ex2R). Cette combinaison d'amorces, située tout près du point de cassure proposé, nous a permis d'amplifier une bande unique de 154 pb dont la spécificité a été confirmée par séquençage. Le séquençage des deux autres bandes majeures d'amplification, représentant des transcrits

alternatifs de la fusion *RUNXI-CLCA2* (T2, 832 pb ; T3, 672 pb), a démontré des fusions entre l'exon 6 de *RUNXI* et l'exon 5 de *CLCA2* (T2) et entre l'exon 6 de *RUNXI* et l'exon 6 de *CLCA2* (T3) (Figs. 4.3B-4.3C). Trois autres bandes d'amplification d'intensité moindre sur le gel ont également été isolées, révélant la présence de trois nouveaux produits de fusion résultant d'un épissage alternatif (T4, 640 pb ; T5, 477 pb ; T6, 444 pb). Des fusions entre l'exon 5 de *RUNXI* et l'exon 5 de *CLCA2* (T4), entre l'exon 5 de *RUNXI* et l'exon 6 de *CLCA2* (T5) ainsi qu'entre l'exon 6 de *RUNXI* et l'exon 7 de *CLCA2* (T6) ont été identifiées (Figs. 4.3B-4.3C).

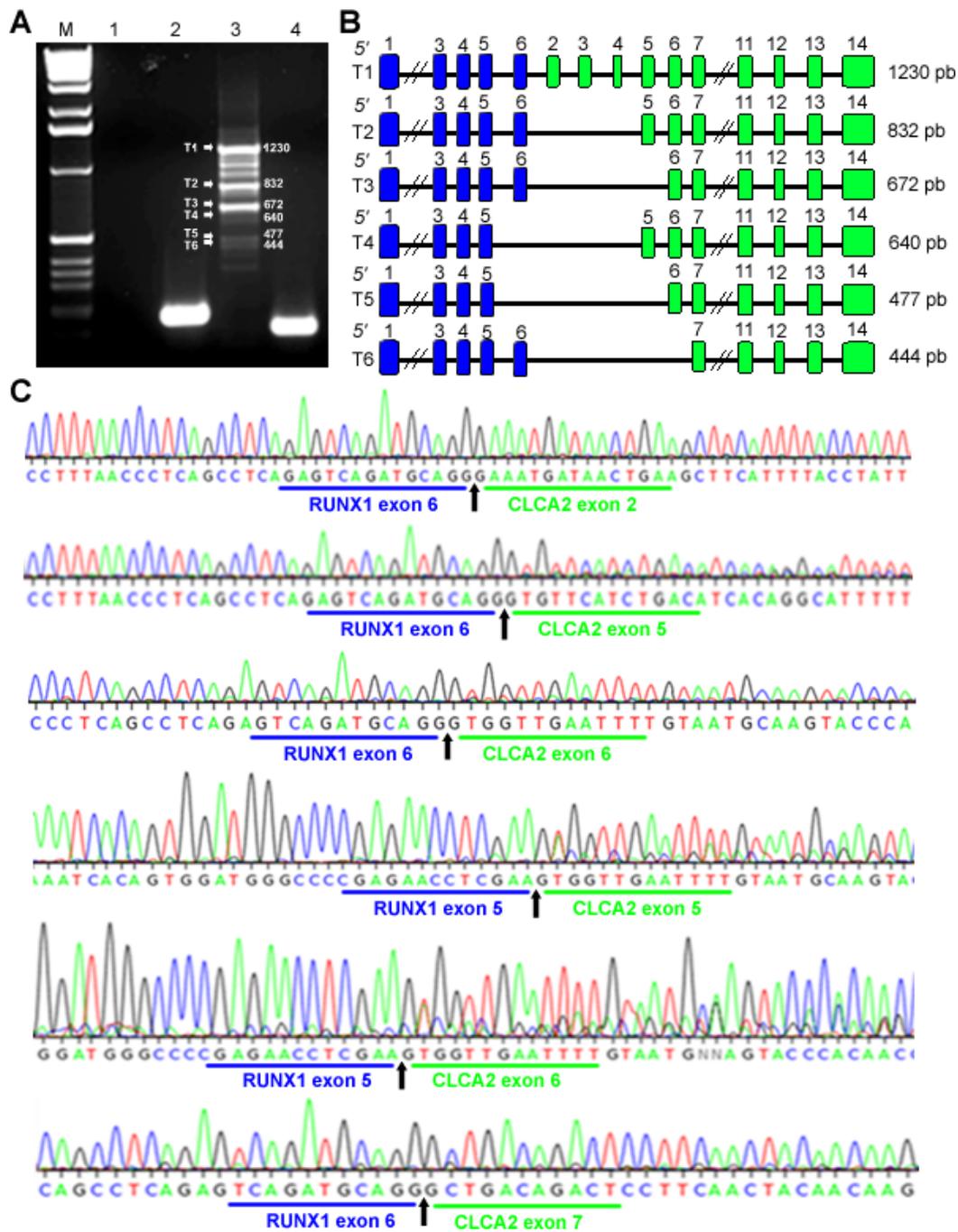


Figure 4.3. Analyse moléculaire des six transcrits alternatifs de la fusion *RUNX1-CLCA2*. (A) Coloration par le bromure d'éthidium du produit de RT-PCR amplifié à partir de l'ARN total extrait des cellules mononuclées du patient avec la

t(1;21)(p22;q22) (puit 3). Au moins six bandes d'amplification spécifiques sont visualisées lors de la migration de ce produit sur un gel d'agarose. Les six transcrits (T1 à T6) sont identifiés par des flèches et le poids respectif de chaque transcrit, amplifié à partir des amorces *RUNX1_ex4,5F* et *CLCA2_ex7R*, est indiqué en paires de base (pb). Contrôle négatif sans ARN (puit 1) ; contrôle positif d'expression correspondant à l'amplification du gène de la bêta actine (*ACTB*) (puit 2 ; 192 pb) ; transcrit majeur de fusion *RUNX1-CLCA2* (T1) résultant d'une amplification par RT-PCR de l'ARN des cellules avec la t(1;21)(p22;q22), à l'aide des amorces *RUNX1_6F* et *CLCA2_2R* (puit 4 ; 154 pb) ; M, marqueur 1 kb. (B) Représentation schématique des six transcrits *RUNX1-CLCA2*. Le poids moléculaire attendu de chaque transcrit amplifié à partir des amorces *RUNX1_ex4,5F* et *CLCA2_ex7R* est indiqué à la droite du schéma. Les boîtes bleues représentent les exons codants de *RUNX1* alors que les boîtes vertes représentent les exons codants de *CLCA2*. (C) Séquences partielles des six transcrits montrant le point de cassure précis de chaque produit d'épissage exprimé suite à la t(1;21)(p22;q22). Une flèche indique le point de cassure.

L'analyse des six transcrits de fusion *RUNX1-CLCA2* nous a permis d'identifier que suite à la fusion des séquences de *CLCA2* à *RUNX1*, le cadre de lecture de *CLCA2* est décalé permettant l'apparition de codons STOP prématurés au sein des séquences de la protéine. Ainsi, les six transcrits de fusion générés par cette t(1;21)(p22;q22) sont dits « out-of-frame ». Selon l'exon de *CLCA2* fusionné à *RUNX1*, le cadre de lecture varie, menant à l'incorporation d'une quantité variable d'acides aminés allant d'un à 45 acides aminés non apparentés à la séquence protéique normale de *RUNX1* ou de *CLCA2* (Table 4.1). Plus spécifiquement, les analyses réalisées à l'aide de l'outil de protéomique « Ribosome virtuel » (www.cbs.dtu.dk/services/VirtualRibosome/) suggèrent qu'un acide aminé est ajouté à la suite de la séquence de *RUNX1* lors de la traduction de la

protéine putative codée par le transcrit T6. Deux acides aminés seraient ajoutés aux protéines codées par les transcrits T3 et T5, quatre acides aminés seraient ajoutés à la protéine traduite par le transcrit T1 alors que 45 acides aminés seraient ajoutés aux protéines prédites engendrées par les transcrits T2 et T4 (Fig. 4.4A et table 4.1). Selon le site d'initiation de la traduction de *RUNX1* utilisé lors de la formation de ces protéines présumées, 27 acides aminés doivent être additionnés à la protéine produite lorsque le codon initiateur (ATG) de l'exon 1 de *RUNX1* est utilisé (Table 4.1). Ces acides aminés dits « aléatoires » ne codent pour aucun domaine ou motif protéique connu, tel que prédit par l'outil de protéomique « InterProScan », <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>.

Transcrit <i>RUNX1-CLCA2</i>	Traduction débutant à l'exon 1 de <i>RUNX1</i>	Traduction débutant à l'exon 3 de <i>RUNX1</i>	Nb d'acides aminés ajoutés suite à <i>RUNX1</i>
T1	272 acides aminés	245 acides aminés	4 acides aminés
T2	313 acides aminés	286 acides aminés	45 acides aminés
T3	270 acides aminés	243 acides aminés	2 acides aminés
T4	249 acides aminés	222 acides aminés	45 acides aminés
T5	206 acides aminés	179 acides aminés	2 acides aminés
T6	269 acides aminés	242 acides aminés	1 acide aminé

Table 4.1. Déduction de la taille en acides aminés des protéines tronquées prédites de *RUNX1* résultant des six transcrits alternatifs de fusion *RUNX1-CLCA2* (T1 à T6). La taille des protéines tronquées finales est indiquée, selon une traduction débutant dans l'exon 1 ou dans l'exon 3 de *RUNX1*. Le nombre d'acides aminés aléatoires additionnés à la suite des séquences protéiques de *RUNX1* est aussi présenté. L'outil de protéomique « Virtual Ribosome » (www.cbs.dtu.dk/services/VirtualRibosome/) a été utilisé afin de réaliser ces prédictions.

L'ajout d'acides aminés aléatoires à la suite des séquences de RUNX1 n'entraîne pas la création de protéine chimérique de fusion, mais plutôt la production de protéines tronquées de RUNX1. L'ensemble des protéines tronquées présumées de RUNX1 générées par ces six transcrits conservent le domaine RHD de liaison à l'ADN et perdent le domaine TAD/ID de régulation transcriptionnelle de RUNX1. Il est à noter que le RHD est traduit par les exons 3 à 5 de *RUNX1* et que les cinq derniers acides aminés du domaine sont codés par l'exon 6 (RHRQK), tel que prédit par le site PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Lors de l'épissage alternatif de l'exon 6, le domaine RHD est théoriquement incomplet, ce qui est le cas pour deux des protéines prédites générées par les transcrits T4 et T5 (Fig. 4.4B).

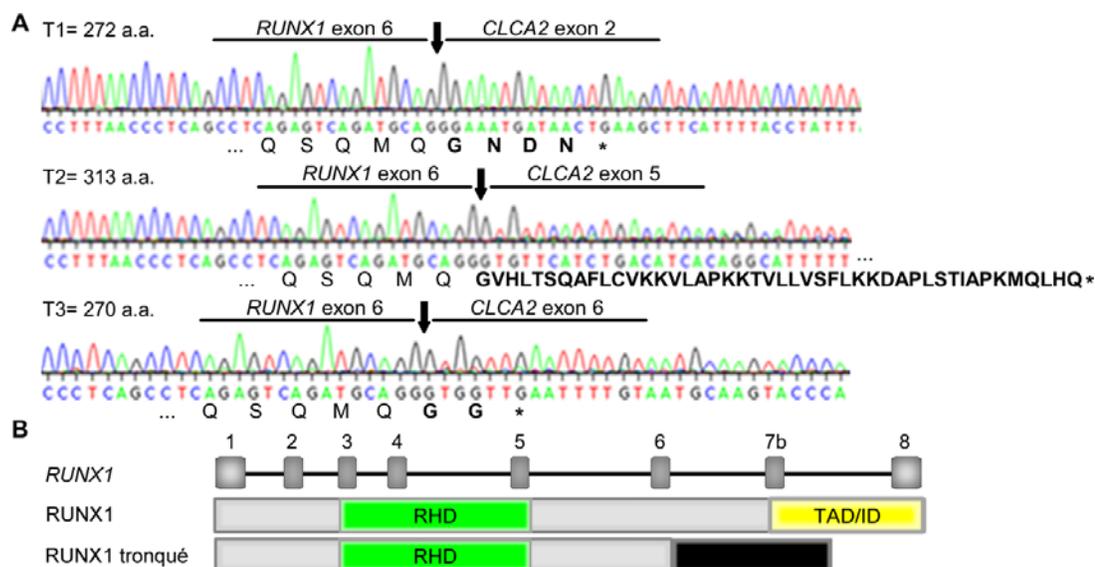


Figure 4.4. Analyse des protéines de RUNX1 tronquées prédites résultant de la *t(1;21)(p22;q22)* et des transcrits *RUNX1-CLCA2*. (A) Déduction des acides aminés codés par les transcrits de fusion T1, T2 et T3. Le nombre d'acides aminés total codé par chaque transcrit est noté, se basant sur une traduction initiée à l'exon 1 de *RUNX1*. Les

flèches représentent les points de cassure. Les astérisques indiquent la fin de la traduction protéique, suite à l'apparition de codon STOP prématuré. Les acides aminés additionnels non apparentés à la séquence protéique de RUNX1 ou de CLCA2 sont représentés en gras. (B) Représentation schématique du gène *RUNX1*, de la protéine RUNX1 sauvage et des produits tronqués de RUNX1 possiblement générés lors de la t(1;21)(p22;q22). La boîte noire représente un nombre variable d'acides aminés non apparentés à RUNX1 ou à CLCA2, lesquels sont ajoutés à la suite de la protéine RUNX1. Le domaine RHD « Runt homology domain » est conservé tandis que le domaine de régulation transcriptionnelle (TAD/ID) est perdu dans toutes les isoformes tronquées prédites.

4.3.2 Étude de la fusion réciproque *CLCA2-RUNX1*

Aucun produit de fusion réciproque n'a été détecté à l'aide d'amorces localisées dans l'exon 1 de *CLCA2* (*CLCA2_ex1F*) et dans l'exon 7 ou 8 de *RUNX1* (*RUNX1_7R*, *RUNX1_ex8R*) et de l'ensemble de RT-PCR « One Step RT-PCR » de Qiagen ou de PCR « HotStar HiFidelity » de Qiagen. De façon intéressante, les expériences de FISH, réalisées à l'aide des sondes en 1p22.3 ciblant le gène *CLCA2*, n'ont pas généré le profil typique d'hybridation à trois signaux (Figs. 4.1D-4.1E; 4.2A). En tenant compte de ces résultats d'hybridation *in situ* et de l'absence de transcrit réciproque de fusion détecté par RT-PCR et PCR, nous avons proposé l'existence d'une délétion ciblant la région 5' et/ou l'exon 1 et/ou l'intron 1 de *CLCA2* (Fig. 4.2B). L'absence de transcrit réciproque ainsi que la délétion de séquences au niveau des points de cassures des gènes impliqués au sein de translocations chromosomiques sont des événements fréquemment décrits dans les néoplasies hématologiques (Paulsson et al., 2006; Foster et al., 2010).

L'exemple le mieux connu est certainement la délétion de séquences sur le chromosome dérivé 9 associée à la t(9;22)(q34;q11.2) des LMC (Kim et al., 2008). Sur le plan protéique, l'absence d'expression d'un transcrit de fusion réciproque mène à la perte d'expression du domaine TAD/ID de RUNX1 dans les cellules leucémiques avec t(1;21)(p22;q22).

4.3.3 Analyse mutationnelle du gène *RUNX1*

Nous avons également réalisé une analyse mutationnelle des exons codant pour le domaine RHD et pour le domaine TAD/ID de l'allèle *RUNX1* sauvage. Un ADNc de *RUNX1* sauvage a été synthétisé à l'aide des amorces RUNX1_1F et RUNX1_8R et de l'ensemble « One step RT-PCR kit » de Qiagen. Le séquençage de l'ADNc a été réalisé à partir des amorces RUNX1_1F et RUNX1_8R ou d'amorces internes RUNX1_2F et RUNX1_7R. L'analyse de l'allèle *RUNX1* sauvage n'a révélé aucune mutation des exons 3 à 5 suggérant que le domaine RHD de RUNX1 sauvage puisse être fonctionnel et capable de réaliser ses fonctions.

4.4 Distinction entre leucémie en rechute et leucémie secondaire à une chimiothérapie antérieure

Pour ce patient, il était intéressant de préciser la nature de la leucémie présentant une t(1;21)(p22;q22), laquelle est apparue suite à un traitement de chimiothérapie et une

allogreffe. Afin de confirmer la possibilité d'une leucémie reliée à une chimiothérapie antérieure, un FISH (sonde RUNX1-RUNX1T1) et des PCR « HotStar HiFidelity PCR » et « One Step RT-PCR kit » de Qiagen (amorces RUNX1_ex4,5F ou RUNX1_ex6F et CLCA2_ex2R ou CLCA2_ex7R) ont été rétrospectivement réalisés sur les cellules cryopréservées de moelle osseuse au moment du diagnostic en 2005. Un décompte de 305 cellules interphasiques et l'analyse de métaphases ont été réalisés par deux observateurs, démontrant un profil d'hybridation normal de la sonde RUNX1-RUNX1T1 dans 96 % des cellules évaluées (293/305 cellules analysées) (Fig. 4.5A). Des douze cellules anormales rencontrées, seuls deux noyaux présentaient un profil d'hybridation à trois signaux verts (*RUNX1*) pouvant être suggestif d'un réarrangement de *RUNX1*. Afin de confirmer l'absence de fusion *RUNX1-CLCA2* dans les cellules au moment du diagnostic, nous avons eu recours à des techniques de PCR. Malgré la plus grande sensibilité de cette technique, les PCR se sont avérées négatives, confirmant l'absence de réarrangement de *RUNX1* dans les cellules au diagnostic.

Une hybridation *in situ* sur des noyaux interphasiques avec une sonde centromérique du chromosome 7 (CEP7) a aussi été réalisée de façon rétrospective sur les cellules cryopréservées de la moelle osseuse du patient 07-0893 avec la t(1;21)(p22;q22). Deux signaux, correspondant aux deux centromères du chromosome 7, ont été détectés dans 97 % des 214 noyaux interphasiques analysés (207/214 cellules analysées, valeur normale de laboratoire pour cette sonde ≤ 7 %) (Fig. 4.5B). Puisque nos résultats suggéraient l'absence de la fusion *RUNX1-CLCA2* dans les cellules au diagnostic et

l'absence de monosomie 7 dans les cellules présentant la $t(1;21)(p22;q22)$, nous avons donc proposé que cette $t(1;21)(p22;q22)$ soit acquise suite à la chimiothérapie reçue.

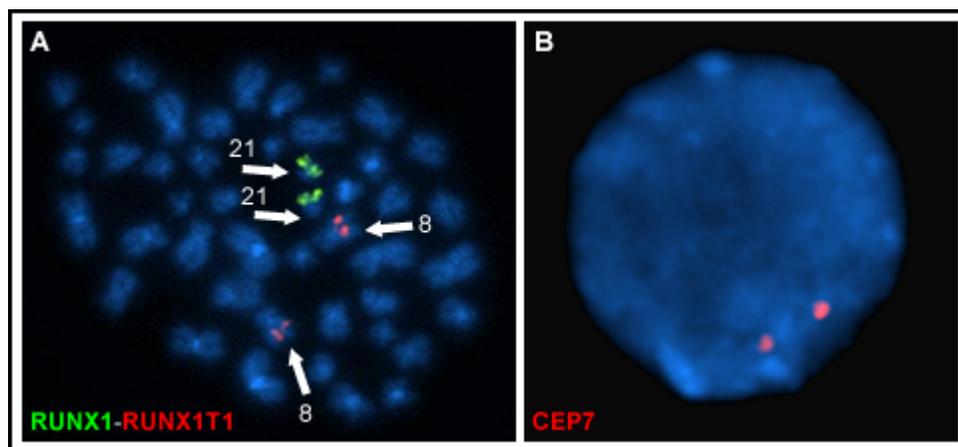


Figure 4.5. Hybridation *in situ* en fluorescence sur les cellules mononuclées de moelle osseuse du patient au diagnostic et au moment de sa leucémie secondaire à la chimiothérapie. (A) Hybridation avec la sonde $RUNX1-RUNX1T1$ réalisée sur les chromosomes métaphasiques du patient atteint de leucémie aiguë myéloïde *de novo*. Deux signaux verts ($RUNX1$) ont été visualisés sur les chromosomes 21, confirmant l'absence de réarrangement de $RUNX1$ dans ces cellules sans $t(1;21)(p22;q22)$. (B) Hybridation avec la sonde centromérique pour le chromosome 7 (CEP7) réalisée sur les noyaux interphasiques du patient avec la $t(1;21)(p22;q22)$. Deux signaux rouges correspondant aux centromères du chromosome 7 ont été visualisés confirmant l'absence de monosomie 7 dans ces cellules avec $t(1;21)(p22;q22)$.

L'acquisition d'anomalies génétiques est fréquemment rapportée dans les néoplasies myéloïdes secondaires à un traitement de chimiothérapie. Les altérations du gène MLL , mais également du gène $RUNX1$, sont particulièrement associées à des traitements par des inhibiteurs de la TOP2 et surviennent en général à l'intérieur d'une période de moins

de 5 ans après le traitement. Nos résultats, sur le plan clinique et moléculaire, plaident en faveur d'une leucémie secondaire à un traitement de chimiothérapie (t-LAM) et plus particulièrement d'une leucémie secondaire à un traitement par des inhibiteurs de la TOP2.

4.5. *CLCA2*, un possible gène suppresseur de tumeur

Le gène *CLCA2* appartient à la famille CLCA « calcium-activated chloride channel » des canaux à ions chlorures activés par le calcium. Chez l'humain, cette famille comprend au moins quatre membres (*CLCA1* à *CLCA4*), tous localisés sur un même locus génomique à la bande 1p22.3 (Loewen and Forsyth 2005). Le gène *CLCA2* contient 14 exons lesquels codent pour une protéine de type précurseur ayant un passage transmembranaire (943 acides aminés). Ce précurseur protéique est glycosylé puis clivé au niveau de la surface cellulaire ce qui permet la production d'une protéine de 35 kDa ayant un passage transmembranaire et d'une protéine de 109 kDa sécrétée dans le milieu extracellulaire qui exprime un domaine von Willebrand de type A (VWA) reconnu pour ses interactions protéines-protéines (Figs. 4.6A-4.6C) (Elble et al., 2006).

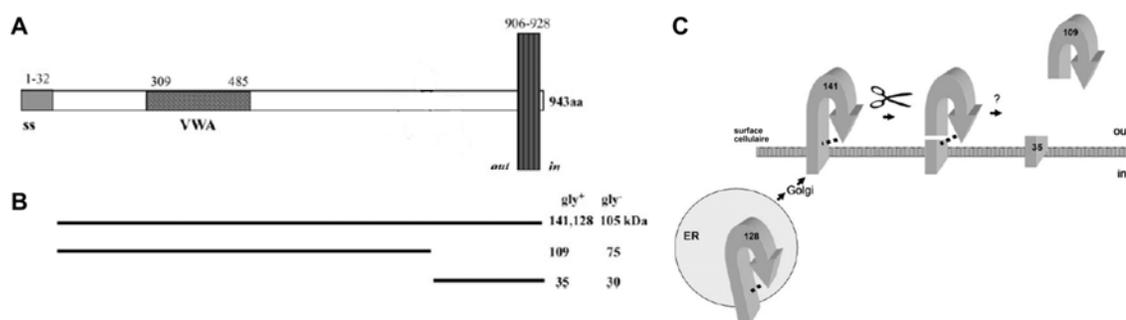


Figure 4.6. La protéine CLCA2. (A) Représentation schématique de la protéine CLCA2 et de ses domaines protéiques. Un peptide signal (ss, acides aminés 1 à 32), un domaine Von Willebrand A (VWA; acides aminés 309 à 485) et un domaine transmembranaire (acides aminés 906 à 928) sont exprimés par la protéine de type précurseur de 943 acides aminés. (B) La protéine de type précurseur et les produits clivés matures, subissant ou non une glycosylation (Gly⁺ ou Gly⁻), sont représentés. (C) La protéine CLCA2 de type précurseur (128 kDa) s'exprime d'abord dans le réticulum endoplasmique puis sera exprimée à la surface membranaire sous une forme glycosylée (141 kDa). CLCA2 subit alors un clivage par une endoprotéase encore non identifiée, menant à l'expression d'une isoforme transmembranaire de 35 kDa et d'une forme libre sécrétée de 109 kDa. Figures reproduites de Elbe et collaborateurs, *J Biol Chem*; 281(40):29448-54 et adaptées avec la permission de « The American Society for Biochemistry and Molecular Biology », copyrights 2006.

La présence d'un seul passage transmembranaire, localisé dans la partie C-terminale de CLCA2, a permis de suggérer que la protéine mature n'agisse pas en tant que canal à ions chlorures, mais plutôt en tant que régulateur du courant chlorure (Elble et al., 2006). Cette même fonction a également été proposée pour d'autres membres de cette famille, autant chez la souris que chez l'humain (Gibson et al., 2005). Par exemple, l'absence de passage transmembranaire dans la protéine humaine CLCA1 et son expression dans le

milieu extracellulaire sont incompatibles avec une fonction de canal à ions, permettant de proposer que les membres de cette famille fonctionnent tels des régulateurs du courant chlorure plutôt que des pores capables d'échanger l'ion chlorure à travers la membrane cellulaire (Gibson et al., 2005).

Divers rôles ont été proposés pour *CLCA2* incluant un rôle dans l'adhésion cellulaire via des interactions avec l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ et un rôle de suppresseur de tumeur dans le cancer du sein (Abdel-Ghany et al., 2001; Elble and Pauli 2001). En effet, *CLCA2* peut soit préférentiellement bloquer la progression du cycle cellulaire lorsqu'il est exprimé dans un contexte cellulaire normal ou soit activer les voies apoptotiques lorsqu'il est surexprimé (Walia et al., 2009). L'expression de *CLCA2* est associée à un fort potentiel anti-prolifératif alors que la diminution de son expression dans des cellules mammaires cancéreuses semble leur conférer un avantage de survie et une résistance à long terme à de multiples drogues. De plus, l'expression plus ou moins forte de *CLCA2* semble prédire la sensibilité de certaines lignées cellulaires à des agents de chimiothérapie tel que la doxorubicine, l'étoposide et la mitomycine C (Walia et al., 2009). Par ailleurs, une hyperméthylation du promoteur de *CLCA2*, menant à la diminution de son expression, a été décrite dans les lignées de cancer du sein (Li et al., 2004).

À l'exception d'un article suggérant un rôle possible de suppresseur de tumeur associé à l'un des gènes du locus 1p22.3 fréquemment délété dans le lymphome du manteau, aucune autre fonction n'a été proposée pour *CLCA2* dans les cancers hématologiques

(Balakrishnan et al., 2006). Nous rapportons donc, pour la première fois, l'implication du gène *CLCA2* dans la leucémie comme nouveau partenaire de *RUNXI* (Giguere and Hebert 2010). Par ailleurs, d'autres gènes codant pour des protéines membranaires ou canaux à ions ont été décrits comme partenaires de fusion de *RUNXI*, formant ainsi une nouvelle catégorie de partenaires (Table 8.1). Dans cette catégorie, mentionnons le gène *KCNMA1* « potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1 » qui code pour une protéine appartenant à la famille des canaux à ions potassium activés par le calcium lequel a récemment été décrit dans un cas de LAM *de novo* avec t(10;21)(q22.3;q22) (Grossmann et al., 2011b). Le gène copine 8 (*CPNE8*), codant pour une protéine de liaison à la membrane dépendante du calcium, a aussi été identifié comme un partenaire de fusion de *RUNXI* dans un cas de t-LAM avec une t(12;21)(q12;q22) (Ramsey et al., 2003). Ces trois protéines membranaires représentent des partenaires rares dont le rôle dans la pathogenèse des LAM demeure à élucider.

4.5 Expression de *CLCA2* dans les cellules hématopoïétiques normales et leucémiques

CLCA2 est particulièrement exprimé dans la glande mammaire (lignée MCF10A dérivée de cellules épithéliales mammaires non-tumorales) et notamment dans la trachée, les reins, les testicules, la prostate, l'utérus et l'épithélium nasal (Gruber and Pauli 1999; Loewen and Forsyth 2005). Nous nous sommes intéressés à étudier l'expression de *CLCA2* dans les tissus hématopoïétiques normaux et leucémiques à l'aide de la

technique de RT-PCR et des amorces *CLCA2_ex8F* et *CLCA2_ex10R* respectivement localisées dans l'exon 8 et l'exon 10 du gène *CLCA2*. Les ARN totaux extraits de deux échantillons de cellules mononuclées de moelle osseuse normale, de deux échantillons de cellules mononuclées de sang périphérique de donneurs normaux, de quatre lignées cellulaires leucémiques (KOPN8, LAL-B avec t(11;19)(q23;p13)/fusion *MLL-ENL* ; OCI-AML3, LAM M4 avec mutation *NPM1* ; MONO-MAC1, LAM M5 avec t(9;11)(p22;q23)/fusion *MLL-MLLT3/AF9* et Kasumi-1, LAM M2 avec t(8;21)(q22;q22)/fusion *RUNX1-RUNX1T1*) et de 21 échantillons primaires de LAM avec différentes morphologies et des caryotypes variés ont été étudiés (Table 4.2). La lignée cellulaire MCF10A a été utilisée comme contrôle positif d'expression de *CLCA2* et le gène *ACTB* a servi de contrôle positif interne de la RT-PCR et de contrôle de charge pour chaque échantillon. Une bande de 302 pb, correspondant à l'amplification des exons 8 à 10 de *CLCA2*, a été détectée et séquencée dans certains échantillons et dans la lignée MCF10A, confirmant la spécificité de la PCR.

BCLQ	Spécimen	Dx	Caryotype
04H025	moelle	M1	46,XY[21]
03H024	moelle	M1	47,XY,+8[18]/48,XY,+8,+8[3]/46,XY[1]
07H160	moelle	M1	45,XX,-7[19]/46,XX[1]
04H001	sang	M1	47,XY,+13[13]/49,XY,+9,+13,+13[7]/46,XY[1]
09H043	moelle	M1	46,XY[21]
09H002	sang	M1	46,XX[23]
05H184	sang	M1	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[20]
03H030	sang	M0	44-48,XX,add(1)(p3?2)[22],del(5)(q13)[17],del(6)(p23)[22],+8[2],add(18)(p11.3)[21],+21[3][cp22]
08H118	sang	M0	42-45,X,-X,-3,del(5)(q15q33),del(7)(q22q32),-14,add(16)(q?13),-17,-17,-20,-22,+1-5mar[cp20]
04H096	moelle	M2	45,XY,-7[3]/46,XY[18]
04H141	moelle	M2	46,XY[20]
03H083	sang	M2	46,XY,t(8;21)(q22;q22),inv(9)(p11q12)c[20]
05H042	sang	M2	47,XY,t(8;21)(q22;q22),+8[21]
05H050	moelle	M4	46,XY[20]
09H013	moelle	M4	46,XY[22]
06H040	moelle	M4	45,X,-Y[19]/46,XY[2]
03H109	moelle	M4Eo	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
03H112	moelle	M4Eo	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
07H144	sang	M4Eo	46,XY,add(2)(q21),der(16)inv(16)(p13q22)?t(2;16)(q21;q22),der(18)?ins(18;?)(q11.2;?)[21]
04H111	sang	M5	47-49,XY,+8,+8,-12,-21,+mar[cp35]
06H073	moelle	M5	46,XY,del(1)(p13)[21]

Table 4.2. Diagnostics morphologiques et caryotypes des 21 échantillons leucémiques sélectionnés pour l'étude d'expression de *CLCA2*. Dx, diagnostic morphologique ; M1, leucémie myéloïde aiguë sans maturation ; M0, leucémie myéloïde aiguë avec différenciation minimale ; M2, leucémie myéloïde aiguë avec maturation ; M4, leucémie myélomonocytaire aiguë ; Eo, avec éosinophiles anormaux dans la moelle ; M5, leucémie monoblastique/monocytaire aiguë.

Nos résultats démontrent que *CLCA2* s'exprime dans les deux échantillons de moelle normale, mais moins fortement que dans le contrôle positif MCF10A. *CLCA2* s'exprime très faiblement dans les deux échantillons de sang périphérique et dans les lignées leucémiques étudiées (Figs. 4.7A-4.7B, 4.7D). Une expression hétérogène de *CLCA2* a toutefois été observée dans les spécimens de LAM étudiés, avec une expression diminuée par rapport aux moelles normales dans 14 échantillons des 21 spécimens analysés (Figs. 4.7A-4.7C). Un plus grand nombre d'échantillons leucémiques, analysés

par une méthode de qRT-PCR, serait requis afin de confirmer une diminution fréquente d'expression du gène *CLCA2* dans les leucémies.

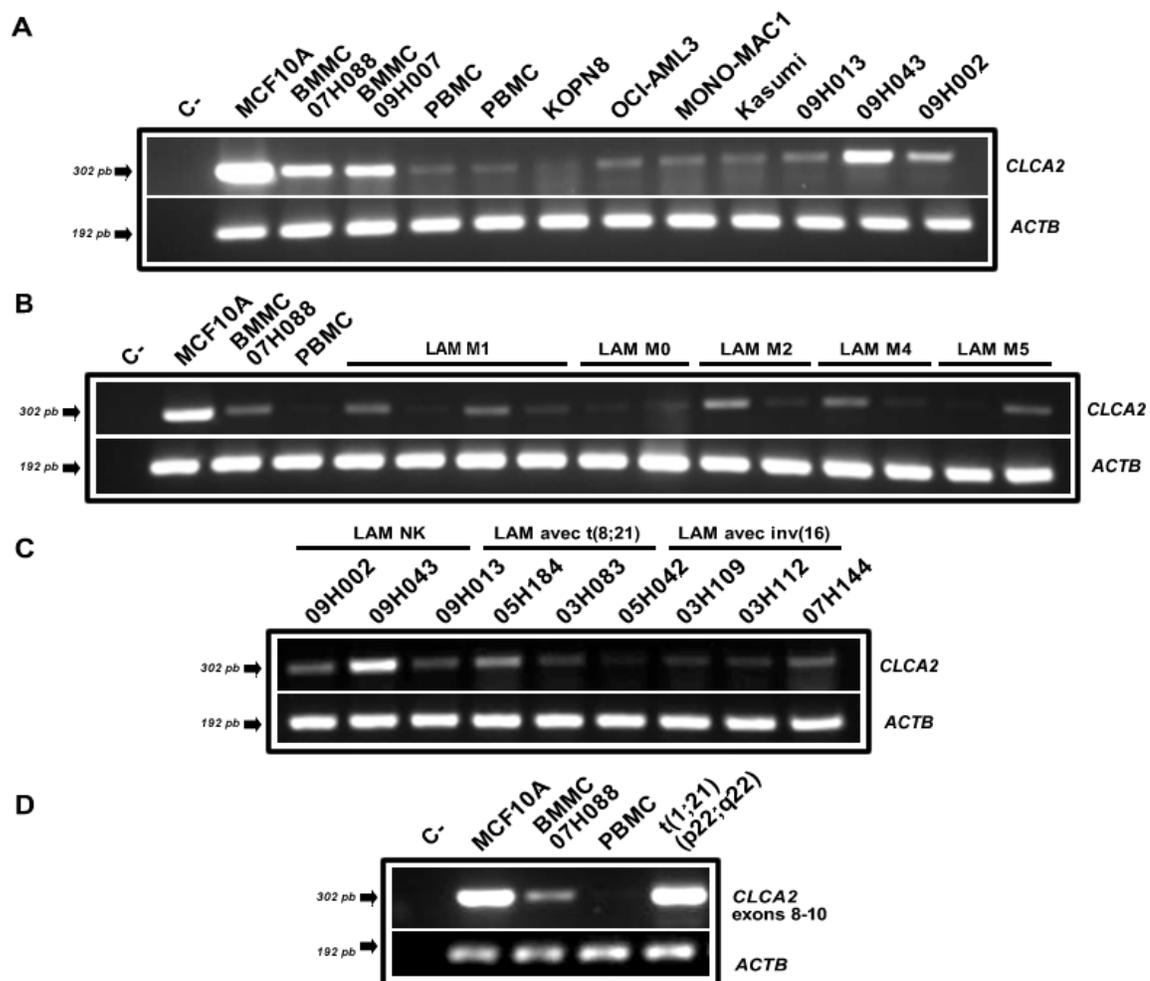


Figure 4.7. Expression du gène *CLCA2*. (A) Expression de *CLCA2* dans les cellules mononuclées isolées de moelle osseuse normale (BMMC) et de sang périphérique normal (PBMC), de quatre lignées de leucémies et de trois spécimens de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) primaires avec un caryotype normal (09H013, 09H043, 09H002). Une expression hétérogène de *CLCA2* (302 pb) est notée dans les échantillons de leucémies primaires. La lignée MCF10A sert de contrôle positif d'expression de *CLCA2* et la bêta actine (*ACTB*) sert de contrôle interne de la RT-PCR (192 pb). (B)

Expression de *CLCA2* dans 12 spécimens de LAM primaires. Une hétérogénéité d'expression est notée. La lignée MCF10A sert de contrôle positif pour l'expression de *CLCA2* tandis que des échantillons de moelle osseuse normale ainsi que de sang périphérique normal servent de contrôle d'expression dans les tissus hématopoïétiques sains. *ACTB* sert de contrôle interne de la RT-PCR. (C) Expression de *CLCA2* dans 9 spécimens de LAM ayant soit un caryotype normal (NK, $n = 3$), une $t(8;21)(q22;q22)$ ($n = 3$) ou une $inv(16)(p13q22)$ ($n = 3$). Une hétérogénéité d'expression est notée. *ACTB* sert de contrôle interne de la RT-PCR. (D) Expression de *CLCA2* dans les cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient avec la $t(1;21)(p22;q22)$. Une forte expression de *CLCA2* est détectée. Un échantillon de moelle osseuse normale et un échantillon de sang périphérique provenant d'un donneur normal servent de contrôle d'expression dans les tissus hématopoïétiques sains alors que *ACTB* sert de contrôle interne de la RT-PCR.

Finalement, nous nous sommes intéressés à l'expression de *CLCA2* dans les cellules mononuclées de la moelle osseuse du patient avec la $t(1;21)(p22;q22)$. Sachant que *RUNX1* est un gène fortement exprimé dans les tissus hématopoïétiques, nous avons émis l'hypothèse que l'expression de *CLCA2* pourrait être augmentée dans les cellules avec $t(1;21)(p22;q22)$ suite au déplacement des séquences de *CLCA2* devant *RUNX1*. Pour ce faire, l'ensemble « OneStep RT-PCR kit » de Qiagen et les amorces *CLCA2_ex8F* et *CLCA2_ex10R* ont été utilisés. Des échantillons de moelle osseuse normale et de sang périphérique normal ont servi de contrôle d'expression dans les tissus sains. La lignée MCF10A a été utilisée en guise de contrôle positif d'expression. Une forte expression de *CLCA2* a été observée dans les cellules avec la $t(1;21)(p22;q22)$ et ce, à un niveau comparable à l'expression visualisée dans le contrôle positif (Fig. 4.7D).

L'expression détectée était nettement plus forte dans les cellules avec la translocation que dans les cellules normales de la moelle osseuse et du sang périphérique, suggérant une surexpression de *CLCA2* dans ces cellules. Notons toutefois que cette forte expression de *CLCA2* ne se traduit probablement pas par une activation de l'expression protéique, en raison du décalage du cadre de lecture apparaissant lors de la fusion des séquences de *CLCA2* à *RUNX1*.

Cette surexpression de *CLCA2* pourrait découler d'une augmentation de l'expression de l'allèle *RUNX1-CLCA2* laquelle est dorénavant sous le contrôle du promoteur de *RUNX1* ou pourrait provenir d'une augmentation de l'expression de l'allèle normal de *CLCA2*. En effet, si *CLCA2* est un gène suppresseur de tumeur, il est plausible que son expression soit fortement régulée et que l'altération d'une copie de ce gène puisse engendrer des mécanismes positifs de régulation menant à une augmentation de l'expression de l'allèle normal. En raison d'une quantité limitée de matériel, ces hypothèses n'ont pas été testées davantage à l'aide de qRT-PCR.

4.6 Mécanismes de leucémogénèse proposés pour la fusion *RUNX1-CLCA2*

La fusion *RUNX1-CLCA2* est particulière dans le sens qu'elle ne résulte pas en la création de protéines chimériques de fusion, mais en la production d'isoformes tronquées de *RUNX1*. Ces isoformes tronquées sont très peu connues et étudiées sur le

plan fonctionnel, en raison du petit nombre d'anomalies 21q22 produisant ce type de protéines RUNX1 plus courtes n'arborant que le domaine RHD. À ce jour, neuf translocations sont dites « out-of-frame » et mènent uniquement à la production de protéines RUNX1 tronquées. Mentionnons la translocation récurrente t(3;21)(q26;q22) des t-SMD/LAM qui fusionne *RUNX1* et *RPL22/EAP* (Zent et al., 1996a) et d'autres translocations plus rares dont la t(4;21)(q28;q22), la t(12;21)(q12;q22), la t(19;21)(q13;q22) et la t(1;21)(p22;q22) présentée ici, impliquant respectivement les gènes *FGA7*, *CPNE8*, *AMP19* et *CLCA2* (Table 4.3) (Hromas et al., 2001; Ramsey et al., 2003; Mikhail et al., 2004; Agerstam et al., 2007; Giguere and Hebert 2010). Avec l'avènement des technologies de séquençage de nouvelle génération, des fusions de *RUNX1* avec de l'ADN génomique (5q13.3, 9q34.4, 10q22.1, 17q21) ont aussi été récemment décrites, étant également incluses dans cette catégorie de fusions « out-of-frame » capables de produire des protéines RUNX1 tronquées (Agerstam et al., 2007; Grossmann et al., 2011b). Enfin, les protéines tronquées peuvent aussi co-exister avec des protéines chimériques de fusion, tel que vu lors de la t(8;21)(q22;q22) des LAM (Table 4.3) (Sakai et al., 2005; Hazourli et al., 2006; Stevens-Kroef et al., 2006; Chinen et al., 2008; LaFiura et al., 2008; Dai et al., 2009).

Type de fusion	Translocation	Fusion	Maladie associée	Point de cassure dans <i>RUNX1</i>	Référence
Transcrits "out-of-frame" uniquement	t(1;21)(p22;q22)	<i>RUNX1-CLCA2</i>	t-LAM	ex 5 et 6 (intron 6*)	Cas présent; Giguere and Hebert, 2010
	t(3;21)(q26;q22)	<i>RUNX1-RPL22/EAP</i>	t-SMD/LAM	ex 6 (intron 6*)	Zent et al., 1996a
	t(4;21)(q28;q22)	<i>RUNX1-FGA7</i>	LAL-T <i>de novo</i>	ex 5 et 6 (intron 6*)	Mikhail et al., 2004
	t(5;21)(q13.3;q22)	<i>chr5-RUNX1</i>	LMMC	intron 1	Grossmann et al., 2011
	t(9;21)(q34.3;q22)	<i>RUNX1-chr9</i>	Transformation aiguë d'une NMP	ex 4 (intron 4*)	Agerstam et al., 2007
	t(10;21)(q22.1;q22)	<i>RUNX1-chr10</i>	LAM M3v	intron 6	Grossmann et al., 2011
	t(12;21)(q12;q22)	<i>RUNX1-CPNE8</i>	t-LAM	ex 6 (intron 6*)	Ramsey et al., 2003
	t(17;21)(q21;q22)	<i>chr17-RUNX1</i>	LAM M1	intron 6	Grossmann et al., 2011
	t(19;21)(q13;q22)	<i>RUNX1-AMP19</i>	t-LAM	ex 5 et 6 (intron 6*)	Hromas et al., 2001
	Co-expression des transcrits "in-frame" et "out-of-frame"	t(1;21)(p36;q22)	<i>RUNX1-PRDM16</i>	LAM M4 <i>de novo</i> t-LAM	ex 6 (intron 6*) ex 6 (intron 6*)
t(2;21)(q11;q22)		<i>RUNX1-LAF4</i>	LMC-PB	ex 5 et 6 (intron 6*)	Hazourli et al., 2006
t(8;21)(q22;q22)		<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	LAL-T <i>de novo</i>	intron 7	Chinen et al., 2008
t(8;21)(q22;q22)		<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	LAM de l'enfant	intron 5**	LaFiura et al., 2008
t(11;21)(q12;q22)		<i>RUNX1-LPXN</i>	LAM M2 <i>de novo</i>	ex 5 et 6 (intron 6*)	Dai et al., 2009

Table 4.3. Translocations menant à l'expression de protéines tronquées de RUNX1 « out-of-frame » ou à la co-expression de protéines tronquées et de protéines chimériques de RUNX1 « in-frame et out-of-frame ». t-, secondaire à un traitement antérieur ; LAM, leucémie aiguë myéloïde ; SMD, syndrome myélodysplasique ; LAL-T, leucémie aiguë lymphoblastique de la lignée T ; NMP, néoplasie myéloproliférative ; chr, chromosome ; LMC, leucémie myéloïde chronique ; ex, exon ; *, point de cassure prédit ; **différents exons de *RUNX1* (1, 2, 3, 4 et 5) sont fusionnés aux séquences de *RUNX1T1*, représentant plus probablement des variants d'épissage que de nouveaux points de cassure.

Une fonction similaire à celle de l'isoforme RUNX1a qui n'exprime que le domaine RHD a été proposée pour ces protéines tronquées anormales de RUNX1 (Miyoshi et al., 1995). Dû à l'absence du domaine TAD/ID dans cette courte forme, RUNX1a ne possède pas de potentiel de transactivation intrinsèque (Tanaka et al., 1995; Liu et al., 2009). Toutefois, RUNX1a possède une capacité de liaison plus forte que RUNX1b au niveau de ses séquences consensus lorsque l'isoforme est exprimée dans des cellules rénales de singe (COS-7 ou CV-1). Cette isoforme est aussi capable de réduire de façon

importante la transactivation dépendante de RUNX1b (Tanaka et al., 1995; Liu et al., 2009). Il a été démontré que la surexpression de *RUNX1a* inhibe la différenciation terminale des cellules myéloïdes de souris 32Dcl3, malgré une stimulation de la différenciation par le facteur de croissance G-CSF lequel permet normalement une maturation des granulocytes (Tanaka et al., 1995). De façon intéressante, il a été démontré que l'expression de RUNX1a dans les cellules de sang de cordon humain, à l'aide de lentivirus, augmente la proportion des cellules hématopoïétiques CD34⁺/CD38⁻ (Tsuzuki et al., 2007). Une sureprésentation du compartiment myéloïde est aussi observée suite à une expression rétrovirale de RUNX1a dans les cellules de moelle osseuse totale de souris (Tsuzuki et al., 2007). En fait, ces études ont permis de clarifier que RUNX1a n'engendrait pas de blocage de la maturation granulocytaire, mais qu'il retardait ce processus afin de favoriser la prolifération des progéniteurs et des cellules plus primitives. De plus, cette équipe a proposé que l'expression normale de cette courte forme, tel qu'étudié par RT-PCR dans des cellules humaines de sang de cordon, était seulement observée dans la population cellulaire CD34⁺ par rapport aux formes *RUNX1b/c* lesquelles s'exprimaient dans les progéniteurs CD34⁺ et dans les cellules myélomonocytaires CD15⁺ (Tsuzuki et al., 2007). Une expression augmentée de *RUNX1a* a notamment été rapportée dans une série de patients atteints de LAM avec maturation sans t(8;21)(q22;q22) et de LAL (Tanaka et al., 1995; Liu et al., 2009). L'expression de RUNX1a peut aussi mener à l'apparition de leucémies lymphoblastiques, et ce, après un long temps de latence lorsque transplantées dans des souris ayant au préalable subies une irradiation pancorporelle totale. Ces résultats

suggèrent que cette isoforme puisse jouer un rôle important lors du développement hématopoïétique (Tanaka et al., 1995; Liu et al., 2009).

D'autres études co-exprimant le gène *RUNX1b* avec certains gènes de fusion « out-of-frame » dont *RUNX1-RPL22/EAP*, *RUNX1-AMP19*, *RUNX1-CPNE8* ou *RUNX1-LPXN* dans des lignées cellulaires variées (Rat1A, 293T ou NIH3T3) ont révélé que l'expression de protéines tronquées mène à une réduction de la capacité de transactivation du CBF au niveau de certains promoteurs myéloïdes tel que CSF1R (Zent et al., 1996b; Hromas et al., 2001; Ramsey et al., 2003). Dernièrement, il a été démontré que la chimère *RUNX1-LPXN* et le produit tronqué « out-of-frame » de cette même fusion peuvent tous deux lier les séquences consensus de *RUNX1* et entrer en compétition avec *RUNX1* sauvage pour ses sites de liaison (Dai et al., 2009). Vu le parallèle intéressant entre *RUNX1a* et les isoformes tronquées, il nous est possible de proposer que les produits tronqués décrits dans ce chapitre puissent aussi entrer en compétition avec *RUNX1* sauvage pour la liaison aux sites consensus, produisant une altération du réseau transcriptionnel de *RUNX1*. Ces protéines tronquées pourraient également agir de façon similaire à *RUNX1a* en augmentant la prolifération et la fréquence des cellules plus immatures, altérant ainsi la balance entre la différenciation et l'auto-renouvellement, deux processus clés dérégulés dans les leucémies.

Enfin, l'haploinsuffisance de *RUNX1* et/ou de *CLCA2* est un autre mécanisme pathogénique potentiellement important de cette fusion. Notamment, l'haploinsuffisance

de *RUNXI* est associée à une prédisposition aux LAM et cette association est supportée par des modèles murins expérimentaux et par l'étude des profils de mutations lors de la progression en LAM de patients FPD (Yamashita et al., 2005; Preudhomme et al., 2009). L'association entre l'haploinsuffisance de *CLCA2* et le cancer est certes, beaucoup moins claire. En raison de la fonction suppresseur de tumeur qui lui est associée dans les cancers du sein, il est intéressant de penser qu'une même fonction puisse être impliquée dans les cancers hématologiques. Les délétions de ce locus rapportées dans le lymphome du manteau témoignent en faveur de ce rôle (Balakrishnan et al., 2006). Ainsi, l'haploinsuffisance de *CLCA2* dans les cellules avec t(1;21)(p22;q22) pourrait mener à un avantage de survie en favorisant une prolifération excessive et non contrôlée des cellules leucémiques.

CHAPITRE 5

5. Étude de la t(8;21)(q23.3;q22)

5.1 Paramètres cliniques cas 10H006

En mai 2008, nous avons reçu à la BCLQ les échantillons de moelle osseuse et de sang périphérique d'un sujet de sexe féminin âgé de 57 ans. La patiente présentait des antécédents de neutropénie isolée depuis 2007. Une formule sanguine complète a démontré un faible décompte de leucocytes de $0,9 \times 10^9/L$ avec 5 % de blastes au frottis sanguin, une thrombopénie ($34 \times 10^9/L$) et de l'anémie (hémoglobine à 93 g/L ; valeur normale pour la femme dans notre laboratoire : 118 à 158 g/L). La moelle osseuse démontrait une absence de mégacaryocytes et la présence de 62 % de blastes positifs pour les antigènes CD117, CD33 et CD13. Une expression aberrante du marqueur CD7 était aussi notée. Un diagnostic de LAM M0 a été établi selon les critères de la classification du WHO (Swerdlow et al., 2008). Le caryotype des cellules médullaires était normal dans les 20 métaphases analysées. Une analyse par FISH, à l'aide de la sonde RUNX1-RUNX1T1, a été effectuée rétrospectivement sur ces cellules. Aucun réarrangement du gène *RUNX1* n'a été observé, cependant une trisomie 8 a été détectée dans 13 % des cellules à l'aide d'une sonde centromérique pour le chromosome 8 (CEP8).

En juin 2008, la patiente a reçu un premier cycle de chimiothérapie d'induction composé de 7 jours de cytarabine et de 3 jours d'idarubicine (inhibiteur de la TOP2). Malheureusement, la patiente a développé de sévères complications (insuffisance cardiaque et infection pulmonaire fongique) empêchant l'administration d'autres cycles de chimiothérapie. Malgré l'arrêt des traitements, une formule sanguine démontrait, en octobre 2008, des valeurs normales de leucocytes ($6,2 \times 10^9/L$), de plaquettes ($254 \times 10^9/L$) et d'hémoglobine (130 g/L).

En janvier 2010, une formule sanguine complète a démontré un faible décompte de leucocytes de $1,0 \times 10^9/L$ avec 20 % de blastes, une thrombopénie (plaquettes à $47 \times 10^9/L$) et de l'anémie (hémoglobine à 88 g/L). L'analyse de l'aspiration médullaire révélait une nette diminution des mégacaryocytes, un arrêt de maturation myéloïde et une dysplasie de la lignée érythroïde. Une infiltration de la moelle osseuse par 26 % de cellules blastiques ayant les mêmes caractéristiques morphologiques qu'au diagnostic et positives pour les antigènes HLA-DR, CD34, CD117 et CD13 a été observée, suggérant une rechute de la LAM. Une LAM liée à la chimiothérapie reçue antérieurement n'est toutefois pas exclue. L'analyse caryotypique de ces cellules médullaires a montré une formule chromosomique anormale avec une délétion terminale au niveau du bras long du chromosome 7 et une translocation entre les bras longs des chromosomes 8 et 21 : $46,XX,del(7)(q22),t(8;21)(q23.3;q22)[19]/46,XX[1]$ (Fig. 5.1A). En raison de la condition générale de la patiente, une thérapie à visée palliative a été instaurée et la patiente est décédée en mai 2010.

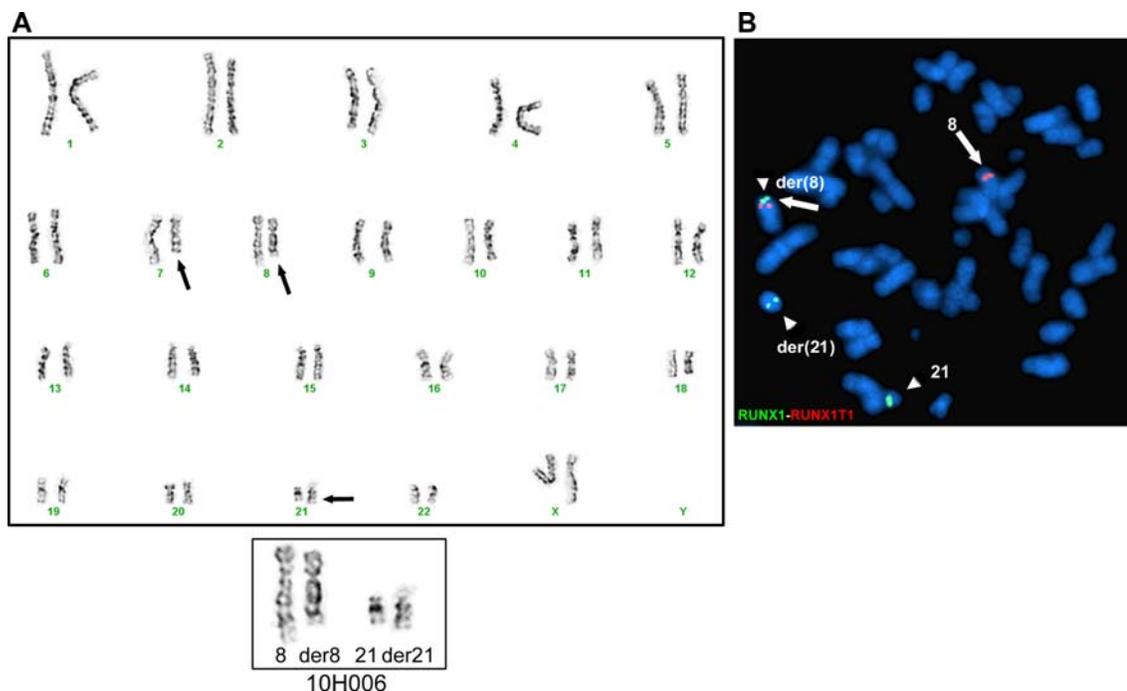


Figure 5.1. Analyse cytogénétique des cellules mononuclées de la moelle osseuse du spécimen de leucémie myéloïde aiguë en rechute présentant la $t(8;21)(q23.3;q22)$. (A) Caryotype en bandes G et partiel montrant des chromosomes 8 et 21 normaux et des chromosomes dérivés 8 [der(8)] et 21 [der(21)] résultant d'une $t(8;21)(q23.3;q22)$. (B) Hybridation de la sonde RUNX1-RUNX1T1 sur les chromosomes métaphasiques du spécimen présentant la $t(8;21)(q23.3;q22)$. Deux signaux rouges (*RUNX1T1* ; 8q22), localisés sur les deux chromosomes 8 (normal et dérivé ; flèches blanches) et trois signaux verts (*RUNX1* ; 21q22), visualisés sur le chromosome 21 normal et sur les deux chromosomes der(8) et der(21) (têtes de flèches blanches), sont représentés. Ce profil d'hybridation à trois signaux verts suggère une cassure localisée au niveau du locus de *RUNX1*.

5.2 Analyse cytogénétique

5.2.1 Identification du point de cassure sur le gène *RUNX1* et étude du gène partenaire

Afin de confirmer l'implication de *RUNX1* dans cette translocation, une technique de FISH a été réalisée par le personnel de la BCLQ à l'aide de la sonde *RUNX1-RUNX1T1*. Un réarrangement de *RUNX1* a été détecté dans 83 % des cellules avec $t(8;21)(q23.3;q22)$. Deux signaux rouges, correspondant aux deux copies normales du gène *RUNX1T1*, ont été observés sur le chromosome 8 normal et sur le chromosome dérivé 8 [der(8)]. Toutefois, trois signaux verts, localisés respectivement sur le chromosome 21 normal et sur les chromosomes dérivés 21 [der(21)] et der(8) ont été visualisés, indiquant la présence d'une cassure localisée au sein du locus de *RUNX1* (Fig. 5.1B). Aucun signal de fusion n'a été détecté, indiquant l'absence d'une fusion *RUNX1-RUNX1T1* sur le der(8). Ces résultats d'hybridation suggéraient également l'absence de trisomie 8 dans ces cellules. Selon la position des signaux sur le der(8), un partenaire de fusion localisé en position télomérique par rapport à *RUNX1T1* (bande chromosomique 8q22) a été proposé. Deux gènes correspondant à ce critère avaient déjà été rapportés dans la littérature comme un partenaire de fusion de *RUNX1* : *ZFPM2/FOG2* (localisé à la bande 8q23.1) et *TRPS1* (localisé à la bande 8q23.3). Le gène *TRPS1*, étant le plus télomérique, a été sélectionné comme candidat pour les analyses de PCR.

5.3 Identification des transcrits des fusions *RUNXI-TRPS1* et *TRPS1-RUNXI*

5.3.1 Identification du gène partenaire de la t(8;21)(q23.3;q22), *TRPS1*, et analyse des transcrits de la fusion principale *RUNXI-TRPS1*

Le gène *TRPS1* a été décrit pour la première fois comme partenaire de fusion de *RUNXI* dans un cas de LAM en rechute avec une t(8;21)(q24;q22) (Asou et al., 2007). La caractérisation moléculaire de cette fusion a permis de révéler la présence de transcrits *RUNXI-TRPS1* fusionnant les exons 5 ou 6 de *RUNXI* avec l'exon 3 de *TRPS1* (Asou et al., 2007). Aucun transcrit réciproque n'a été détecté dans ce cas. Basé sur la description moléculaire de ces transcrits, nous avons sélectionné différentes combinaisons d'amorces ciblant la jonction des exons 4 et 5 de *RUNXI* (RUNX1_4,5F) et les exons 3 et 4 de *TRPS1* (TRPS1_3R, TRPS1_4R) (Table 2.5). Des RT-PCR ont été réalisées, à l'aide de l'ensemble « OneStep RT-PCR kit » de Qiagen sur les ARN totaux extraits de trois spécimens incluant le cas avec la t(8;21)(q23.3;q22), un cas de t(8;21)(q22;q22)/fusion *RUNXI-RUNXIT1* et la lignée Kasumi-1/fusion *RUNXI-RUNXIT1*. Les conditions suivantes ont été utilisées : 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 60°C pendant 30 secondes et d'extension à 72°C pendant une minute.

Au moins deux bandes ont été visualisées par cette méthode (T1, 641 pb ; T2, 449 pb) dans les cellules de la LAM en rechute avec t(8;21)(q23.3;q22), suggérant l'existence de possibles transcrits de fusion *RUNXI-TRPS1* (Fig. 5.2A, puit 3 versus puits 4-5). Le séquençage de ces produits a confirmé la présence de deux transcrits respectant le cadre de lecture et fusionnant l'exon 5 ou 6 de *RUNXI* et l'exon 3 de *TRPS1* (Figs. 5.2B-5.2C).

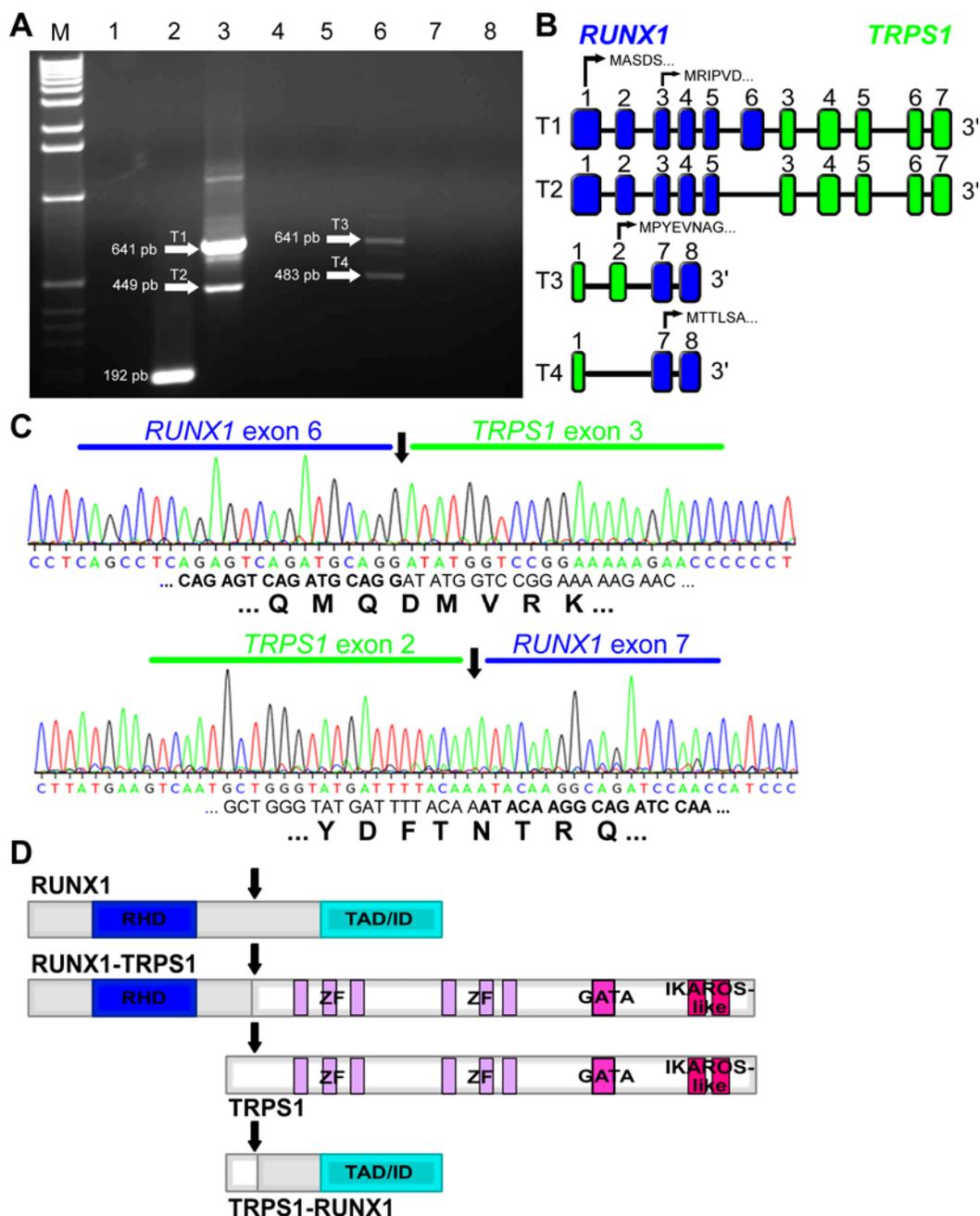


Figure 5.2. Étude moléculaire des transcrits des fusions *RUNX1-TRPS1* et *TRPS1-RUNX1*. (A) Gel de bromure d'éthidium montrant l'amplification de deux transcrits de la fusion *RUNX1-TRPS1* (T1, 641 pb ; T2, 449 pb) (flèches blanches) et de deux transcrits de la fusion réciproque *TRPS1-RUNX1* (T3, 641 pb ; T4, 483 pb) (flèches

blanches) par RT-PCR à partir des cellules mononuclées de la patiente présentant la t(8;21)(q23.3;q22). M, marqueur moléculaire de 1 kb. Puit 1, contrôle négatif sans ARN ; puit 2, contrôle positif d'expression correspondant à l'amplification partielle des exons 4 et 5 de la bêta-actine (*ACTB*) (puit 2 ; 192 pb) ; puits 3 et 6, cellules de la patiente avec la t(8;21)(q23.3;q22) ; puits 4 et 7, cellules du spécimen avec une t(8;21)(q22;q22)/fusion *RUNXI-RUNXITI* ; puits 5 et 8, cellules de la lignée Kasumi-1/fusion *RUNXI-RUNXITI*. (B) Représentation schématique des deux transcrits *RUNXI-TRPS1* (T1 et T2) et des deux transcrits réciproques *TRPS1-RUNXI* (T3 et T4). Les boîtes bleues et vertes représentent respectivement les exons codants de *RUNXI* et de *TRPS1*. Les sites possibles d'initiation de la traduction de *RUNXI* et de *TRPS1* (flèches noires) et la séquence en acides aminés traduite à partir de ces sites sont indiqués. (C) Séquences partielles des transcrits de fusion *RUNXI-TRPS1* (T1) et *TRPS1-RUNXI* (T3). Les points de cassure sont indiqués par une flèche. Les séquences du gène *RUNXI* sont représentées en gras. Une déduction des acides aminés codés par chacun de ces transcrits est représentée. (D) Représentation schématique des protéines sauvages *RUNX1* et *TRPS1* ainsi que des protéines chimériques *RUNX1-TRPS1* et *TRPS1-RUNX1* prédites. Les flèches montrent des points de cassure après l'exon 6 de *RUNX1* et avant l'exon 3 de *TRPS1*. RHD, « Runt homology domain » ; TAD/ID, domaine de régulation transcriptionnelle ; ZF, motif en doigt de zinc ; GATA, motif en doigt de zinc GATA ; Ikaros-like, double motif en doigt de zinc « Ikaros-like ».

5.3.2 Analyse des transcrits de la fusion réciproque *TRPS1-RUNXI*

L'amplification des transcrits de la fusion réciproque a été réalisée à l'aide de l'ensemble « OneStep RT-PCR kit » de Qiagen et d'amorces localisées dans l'exon 1 de *TRPS1* (TRPS1_1F) et dans l'exon 8 de *RUNXI* (RUNX1_8R) (Table 2.5). Deux bandes ont été spécifiquement détectées dans les cellules présentant la t(8;21)(q23.3;q22) (T3,

641 pb ; T4, 483 pb) (Fig. 5.2A, puit 6). Le séquençage de ces produits a révélé l'existence de deux transcrits de fusion réciproque *TRPS1-RUNX1* respectant le cadre de lecture lesquels fusionnent soit l'exon 1 ou 2 de *TRPS1* et l'exon 7 de *RUNX1* (Figs. 5.2B-5.2C). L'épissage alternatif de l'exon 2 de *TRPS1* est un évènement rapporté dans les séquences sauvages du gène et ne représente possiblement pas en soi un évènement relié à la leucémogénèse, au même titre que l'épissage de l'exon 6 de *RUNX1* précédemment rapporté (Chang et al., 2002).

Des protéines *RUNX1-TRPS1* prédites devraient être exprimées dans les cellules de la LAM en rechute avec la t(8;21)(q23.3;q22) puisque les deux transcrits de la fusion principale, T1 et T2, respectent le cadre de lecture. Ces protéines chimériques présumées expriment le domaine RHD de *RUNX1* de même que les deux domaines GATA et IKAROS-like de *TRPS1* (Fig. 5.2D). L'épissage de l'exon 6 de *RUNX1* dans le transcrit T2 engendre la perte des cinq derniers acides aminés du domaine RHD, tel que décrit pour les fusions *RUNX1-USP42* et *RUNX1-CLCA2*. Des protéines *TRPS1-RUNX1* prédites exprimant le TAD/ID de *RUNX1* sont aussi probablement exprimées suite à la traduction du transcrit réciproque T3. Il est à noter que le site d'initiation de la traduction respectant la séquence Kozak est localisé dans l'exon 3 de *TRPS1*, mais un site d'initiation alternatif de la traduction est décrit dans l'exon 2. Ainsi, le transcrit réciproque T4, lequel résulte d'un épissage alternatif de l'exon 2 de *TRPS1*, forme plutôt des protéines tronquées de *RUNX1* traduites à partir de sites alternatifs d'initiation de la traduction retrouvés dans les exons 7 et 8 de *RUNX1* (Figs. 5.2B ; 5.2D).

5.4 Identification des jonctions génomiques des fusions

RUNX1-TRPS1* et *TRPS1-RUNX1

5.4.1 Analyse des jonctions génomiques des fusions *RUNX1-TRPS1* et *TRPS1-RUNX1*

Les transcrits T1 et T2 identifiés dans les cellules du cas présentant la t(8;21)(q23.3;q22) fusionnent l'exon 5 ou 6 de *RUNX1* avec l'exon 3 de *TRPS1* suggérant l'existence de points de cassures de l'ADN génomique dans l'intron 6 de *RUNX1* (34,95 kb) et dans l'intron 2 de *TRPS1* (3,54 kb). À l'aide de l'ensemble de PCR à haute fidélité « *Taq Platinum Polymerase High fidelity* » de Invitrogen et de plusieurs combinaisons d'amorces, nous avons spécifiquement identifié les jonctions génomiques des fusions *RUNX1-TRPS1* et *TRPS1-RUNX1*. Différentes conditions ont été testées jusqu'à l'obtention de produits spécifiques amplifiés à l'aide d'amorces sens localisées dans l'intron 6 de *RUNX1* (RUNX1_int6_1F ou RUNX1_int6_2F) et anti-sens localisées dans l'intron 2 de *TRPS1* (TRPS1_int2_R) pour la fusion principale et d'amorces sens localisées dans l'intron 2 de *TRPS1* (TRPS1_int2_F1 ou TRPS1_int2_F2) et anti-sens localisées dans l'intron 6 de *RUNX1* (RUNX1_int6_R1 ou RUNX1_int6_R2) pour la fusion réciproque (Fig. 5.3, table 2.4). Les conditions suivantes d'amplification ont été utilisées : 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 60°C pendant 30 secondes et d'extension à 68°C pendant 3 minutes.

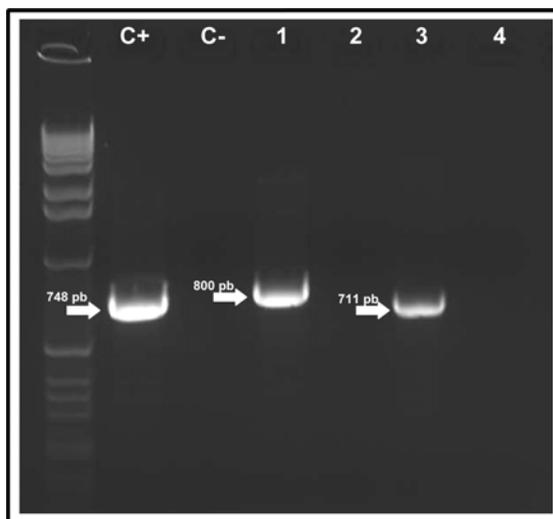


Figure 5.3. Gel de bromure d'éthidium montrant les produits d'amplification correspondant aux jonctions génomiques des fusions *RUNX1-TRPS1* et *TRPS1-RUNX1*. C+, amplification partielle de 748 paires de base (pb) de l'intron 7 de *RUNX1*. C-, contrôle négatif sans ARN. Puit 1, amplification de la jonction de la fusion *RUNX1-TRPS1* à partir de l'ADN isolé des cellules mononuclées du spécimen présentant la t(8;21)(q23.3;q22) et des amorces RUNX1_int6_2F et TRPS1_int2_R. Puit 2, absence d'amplification d'une jonction *RUNX1-TRPS1* dans les cellules de la lignée REH, à l'aide des amorces RUNX1_int6_2F et TRPS1_int2_R. Puit 3, amplification de la jonction de la fusion *TRPS1-RUNX1* dans les cellules présentant la t(8;21)(q23.3;q22), à l'aide des amorces TRPS1_int2_F2 et RUNX1_int6_R2. Puit 4, absence d'amplification d'une jonction de la fusion *TRPS1-RUNX1* dans les cellules de la lignée REH, à l'aide des amorces TRPS1_int2_F2 et RUNX1_int6_R2.

Le séquençage a montré des points de cassures localisés dans l'intron 6 de *RUNX1* (chr21:36178172-36178175) et dans l'intron 2 de *TRPS1* (chr8:116633346-116633349) pour la fusion principale *RUNX1-TRPS1* exprimée par le der(21) (Fig. 5.4A). Des points

de cassures identiques localisés dans l'intron 2 de *TRPS1* (chr8:116633346-116633349) et dans l'intron 6 de *RUNX1* (chr21:36178172-36178175) ont été identifiés par séquençage pour la fusion réciproque *TRPS1-RUNX1* exprimée par le der(8) (Fig. 5.4B). Notamment, une séquence identique de 3 nucléotides [5'-TTA-3'] a été retrouvée à la jonction des deux fusions, empêchant l'identification du point de cassure précis pour chacune d'elle. Ces nucléotides sont normalement présents dans la séquence sauvage des deux gènes *RUNX1* et *TRPS1* et ont possiblement servi de microhomologie lors de l'alignement et de la recombinaison erronée des deux extrémités non identiques. Enfin, le partage d'une microhomologie TTA entre les deux fusions permet la conservation des séquences complètes et la création de jonctions dites parfaites, sans ajout ni perte de séquence. Cette jonction est donc balancée sur le plan génomique (Fig. 5.4C).

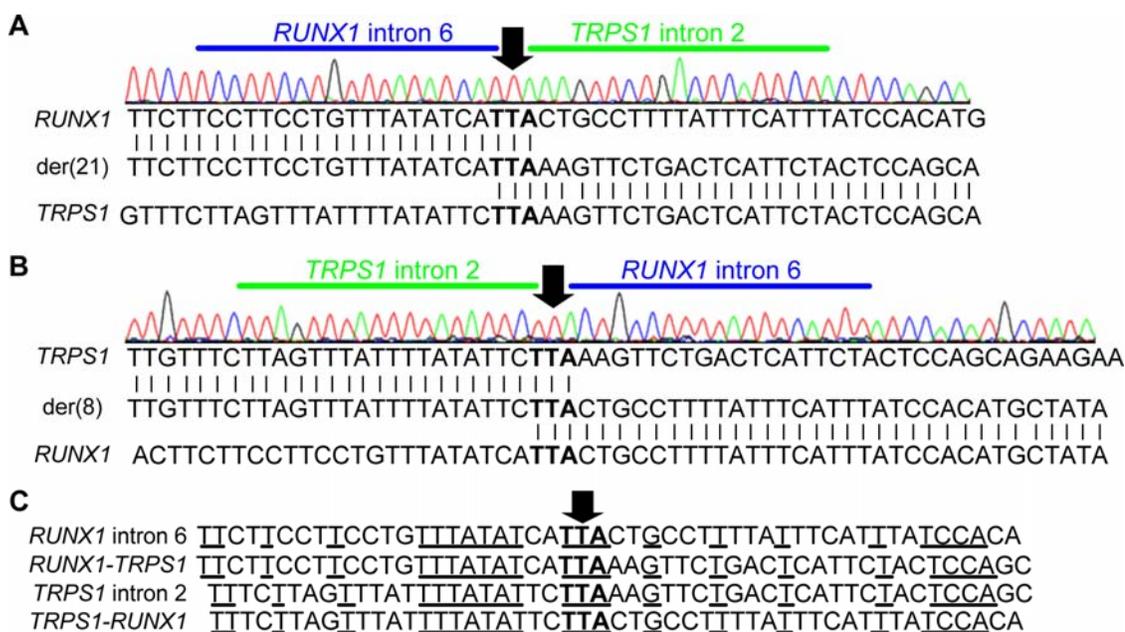


Figure 5.4. Analyse des points de cassures génomiques des fusions *RUNXI-TRPS1* et *TRPS1-RUNXI*. (A) Séquence partielle d'ADN de la fusion *RUNXI-TRPS1* montrant un point de cassure génomique localisé dans l'intron 6 de *RUNXI* et dans l'intron 2 de *TRPS1*. Une microhomologie de trois nucléotides (TTA ; en gras) est identifiée directement à la jonction de la fusion principale. Une flèche indique le point de cassure et les lignes verticales indiquent l'homologie entre les séquences. (B) Séquence partielle d'ADN de la fusion *TRPS1-RUNXI* montrant un point de cassure génomique localisé dans l'intron 2 de *TRPS1* et dans l'intron 6 de *RUNXI*. Une microhomologie de trois nucléotides (TTA ; en gras) est identifiée au point de cassure de la fusion réciproque. Une flèche indique le point de cassure et les lignes verticales indiquent l'homologie entre les séquences. (C) Séquences partielles de l'ADN adjacent au point de cassure des deux fusions *RUNXI-TRPS1* et *TRPS1-RUNXI*. Un alignement des 50 nucléotides présents de part et d'autre des points de cassure des fusions *RUNXI-TRPS1* et *TRPS1-RUNXI* et des 50 nucléotides des séquences endogènes de l'intron 6 de *RUNXI* et de l'intron 2 de *TRPS1* (tirées du « UCSC genome browser » version GRCh37/hg19) est montré. L'homologie des séquences est soulignée (22/50 nucléotides d'homologie). La flèche indique les points de cassures des deux fusions.

À l'aide de l'outil bioinformatique RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) et avec la méthode décrite à la section 3.4.1, nous avons vérifié la présence d'éléments caractéristiques de certains mécanismes de recombinaison de l'ADN dans les séquences adjacentes aux points de cassures des deux fusions. Puisqu'aucune variation n'a été détectée entre les séquences des fusions et les séquences endogènes tirées du site « UCSC genome browser » version GRCh37/hg19, ces dernières ont été utilisées pour la recherche de site consensus de la TOP2 et de la DNase I (séquence consensus :

GGNTAARYRYTYATCC) et pour la recherche d'éléments répétés et de séquences RSS (Baum and Giles 1986; Spitzner and Muller 1988; Aplan et al., 1996).

L'analyse des séquences adjacentes au point de cassure de la fusion réciproque *TRPSI-RUNXI* a permis l'identification de deux motifs de 26 pb hautement conservés des éléments de type ALU de part et d'autre de cette jonction (5'-CCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGC ou le complément inverse 3'-GCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGG). Ces deux séquences ont été retrouvées respectivement à environ 561 pb devant le point de cassure (chr8:116633881-116633906 ; hit : 26/26 pb ; 100 % d'identité) et à approximativement 872 pb après la cassure (chr21:36177303-36177328 ; hit : 25/26 pb ; 97 % d'identité). Il est également intéressant de noter que 22 des 50 nucléotides adjacents aux points de cassures des deux fusions sont homologues (44 % d'homologie) (Fig. 5.4C). Cette homologie passe à 83 % au niveau des 12 nucléotides adjacents aux jonctions, nous permettant de croire que cette similitude entre les deux extrémités non identiques pourrait également contribuer à l'appariement erroné et à la recombinaison de ces extrémités (Fig. 5.4C).

Cette séquence de 26 pb, représentant un motif central des éléments répétés de la famille ALU, a été décrite comme un site particulièrement sensible à la recombinaison (Rudiger et al., 1995; Hasan et al., 2010). Les éléments ALU n'ont été que très rarement discutés dans la genèse des translocations *RUNXI* (Nguyen et al., 2006). Toutefois, ils ont été

décrits lors des duplications en tandem des gènes *MLL* et *MYB* identifiées respectivement dans les LAM et dans les LAL de la lignée T (Strout et al., 1998; O'Neil et al., 2007). Dernièrement, un tel motif a été identifié dans le BCR de l'intron 2 de *RARA* près de plusieurs points de cassures identifiés chez des patients atteints LPA *de novo* ou de LPA secondaire à une thérapie antérieure, les incriminant ainsi dans la genèse de ces réarrangements (Hasan et al., 2010). Puisque ces sites ont été observés à moins de 1 kb de distance, et ce, de part et d'autre du point de cassure de la fusion réciproque *TRPS1-RUNX1*, ils pourraient être impliqués dans la genèse de la t(8;21)(q23.3;q22) étudiée ici. Cependant, il est important de se rappeler que pour qu'une recombinaison homologue puisse survenir, une homologie d'environ 200 pb est requise au point de cassure (Rubnitz and Subramani 1984), supportant plutôt qu'une recombinaison de type NHEJ soit le mécanisme le plus probable à l'origine de cette translocation.

Puisque le traitement de la patiente incluait de l'idarubicine, un inhibiteur de la TOP2, une recherche permettant l'identification de sites *in vitro* de clivage de l'enzyme a été réalisée. Deux sites consensus *in vitro* de la TOP2 ont été identifiés dans l'intron 6 de *RUNX1* environ 6,7 kb avant le point de cassure (chr21:36184900-36184917 ; ATTACCAAGCGGTTTTGT) et environ 3 kb après le point de cassure (chr21:36175114-36175131 ; GTCATCCAGTTGGTTTAT). Toutefois, aucun site TOP2 n'a été identifié directement ou à proximité des points de cassures, ni dans l'intron

2 de *TRPS1*. Malgré que nous n'ayons pas réussi à identifier de tels sites au niveau des points de cassures ou à proximité de ceux-ci, la présence d'une microhomologie de 3 nucléotides à la jonction de chacune des fusions et le balancement des jonctions suggèrent fortement que les TOP2 soient responsables de l'apparition des bris au niveau des séquences de *RUNXI* et de *TRPS1*. Deux mécanismes sont alors possibles en tenant compte de la composition des jonctions : un échange entre deux sous-unités TOP2/ADN suivi d'une correction des mésappariements par le NHEJ (rôle direct des TOP2) ou une recombinaison de type NHEJ parfaite basée sur les 3 nucléotides homologues (rôle indirect des TOP2) (voir Fig. 9.2). Dans l'une ou l'autre des possibilités, le mécanisme non-homologue de type NHEJ est requis, établissant donc ce mode de recombinaison comme un élément central dans la genèse de cette $t(8;21)(q23.3;q22)$. Une explication plus détaillée des mécanismes proposés sera fournie dans la discussion, à la section 8.3.

5.4 TRPS1, un membre unique de la famille des facteurs de transcription GATA

TRPS1 « tricho-rhino-phalangeal syndrome 1 » (aussi nommé GC79) est un gène localisé à la bande chromosomique 8q23.3 qui a été découvert grâce à l'étude des anomalies moléculaires responsables du syndrome tricho-rhino-phalangien (TRPS) (Momeni et al., 2000). Des mutations inactivatrices (« missense » et insertion « frameshift »), des délétions ainsi que des aberrations chromosomiques de la bande

8q23.3 ciblant ce gène *TRPS1* ont été décrites dans le syndrome autosomal dominant héréditaire TRPS de type I lequel est caractérisé par des malformations craniofaciales, des anomalies squelettiques et de l'alopecie (Momeni et al., 2000; Piccione et al., 2009). Les syndromes de type II (Syndrome de Langer-Giedion) et de type III (Syndrome de Sugio-Kajii) ont par la suite été reconnus. Le TRPS de type II se distingue du type I par la présence d'un retard mental, d'exostoses multiples en plus des autres conditions du TRPS de type I chez le patient et est caractérisé, sur le plan moléculaire, par des mutations des gènes *TRPS1* et *EXT1*. Le TRPS de type III se distingue par la présence d'un raccourcissement généralisé et sévère des phalanges et des métacarpes, par l'absence des caractéristiques du type II chez le patient et par des mutations plus spécifiques de l'exon 6 de *TRPS1* codant pour le domaine GATA de la protéine (Fig. 5.5).

Il est intéressant de noter que *TRPS1* s'exprime de façon ubiquitaire dans les tissus adultes, avec une expression beaucoup plus faible dans les mêmes tissus fœtaux. Chez le fœtus, l'expression la plus forte est décrite au jour E11.5 et corrèle avec les sites d'affectation chez l'humain du syndrome TRPS. Une forte expression de *Trps1* est décrite dans l'os maxillaire, dans la mandibule et dans le museau des souris au jour E12.5. Au jour E12.5-13.5, une forte expression est aussi rapportée dans les phalanges et dans la tête fémorale de la hanche en développement puis dans les follicules pileux. Ces études d'expression supportent le fait que les caractéristiques cliniques du TRPS apparaissent très tôt et découlent probablement d'une haploinsuffisance de *TRPS1* lors

des étapes de développement. Chez l'adulte, une forte expression est particulièrement décrite dans la glande mammaire, la prostate, les testicules et les ovaires tandis qu'une faible expression est notée dans le foie, le colon, le cœur, l'utérus et le cerveau (Chang et al., 2000). Dans les tissus hématopoïétiques, une expression est décrite dans les leucocytes, la rate et le thymus tandis qu'une plus faible expression de *TRPS1* est décrite dans les ganglions et la moelle osseuse (Chang et al., 2000).

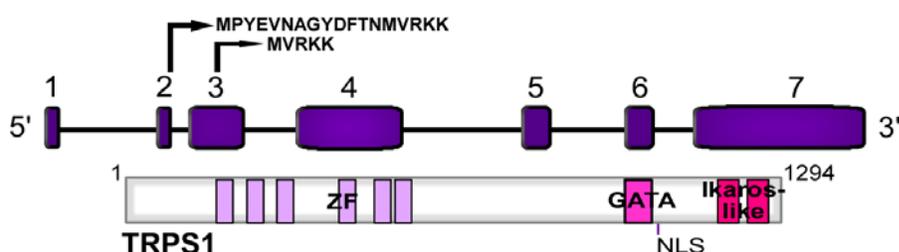


Figure 5.5. Représentation schématique du gène *TRPS1* et de la protéine TRPS1. La protéine de 1294 acides aminés se compose de six domaines en doigt de zinc (ZF), d'un domaine GATA, d'un signal de localisation nucléaire (NLS) et de deux motifs en doigt de zinc « IKAROS-like ». Les sites d'initiation de la traduction localisés dans l'exon 2 et dans l'exon 3 de *TRPS1* sont représentés (flèches) ainsi que le début de la séquence protéique découlant des codons initiateurs ATG localisés dans ces exons.

Le gène *TRPS1* contient 7 exons (260 kb) codant pour un facteur de transcription nucléaire de la famille GATA (140 kDa) de 1294 acides aminés (site d'initiation de la traduction dans l'exon 2) ou de 1281 acides aminés (site d'initiation de la traduction dans l'exon 3) (Fig. 5.5). Lors de sa découverte, l'analyse prédictive de la structure de TRPS1 a révélé la présence de neuf motifs en doigt de zinc distribués tout au long de la protéine, permettant l'établissement d'une similarité unique avec la famille GATA et la

famille IKAROS. Les six premiers motifs de type doigt de zinc possèdent une structure C_2H_2 , mais ne partagent pas de similitude significative avec d'autres protéines. TRPS1 est composé d'un seul motif C_4 homologue aux autres membres de la famille GATA (77 % d'homologie avec GATA1 à 6) suivi d'un signal NLS et de deux motifs terminaux C_2H_2 similaires aux deux doigts de zinc des facteurs de transcription de la famille IKAROS (55 % d'homologie) (Chang et al., 2000; Momeni et al., 2000). Le domaine GATA procure à TRPS1 une capacité de liaison à l'ADN au niveau des séquences consensus [A/T(GATA)A/G] (Malik et al., 2001). Les interactions protéines-protéines, une capacité de dimérisation et un pouvoir répressif sont des fonctions reliées aux deux motifs « IKAROS-like » de TRPS1, permettant à cette protéine d'agir en tant que répresseur de l'activation transcriptionnelle dépendante de GATA (Malik et al., 2001; van den Bemd et al., 2003). Comme la plupart des membres de la famille GATA, TRPS1 participe à la liaison de l'ADN et régule l'expression d'une variété de cibles, et ce, à l'intérieur de larges complexes multiprotéiques.

5.5 Expression différentielle de l'allèle sauvage et de l'allèle réarrangé de *TRPS1*

Puisque *RUNX1* fusionne avec les séquences de *TRPS1* les plaçant sous le contrôle de son promoteur, l'expression de *TRPS1* est potentiellement augmentée. Afin d'évaluer l'expression différentielle des deux allèles de *TRPS1* (sauvage et réarrangé), nous avons utilisé deux essais Taqman® ciblant respectivement la jonction des exons 2 et 3 de

TRPS1 (IR3039 ; allèle *TRPS1* sauvage) et la jonction des exons 6 et 7 de *TRPS1* (IR3040.3 ; allèle *TRPS1* réarrangé et allèle normal). Puisque la translocation engendre une dissociation des exons 2 et 3 de *TRPS1*, seul l'allèle sauvage sera amplifié avec l'essai spécifique à cette jonction, nous permettant de distinguer l'expression provenant de chaque allèle.

L'ARN total extrait de sept spécimens de LAM incluant celui de la LAM en rechute présentant la t(8;21)(q23.3;q22) et de trois moelles normales de donneurs sains (Annexe, table 9.8), des « random primers » et l'ensemble « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » de ABI ont été utilisés afin de synthétiser les ADNc. Deux contrôles endogènes (*TBP* et *HPRT*) ont été évalués et le gène *HPRT* a été sélectionné pour l'analyse finale. Une moyenne des valeurs de RQ des trois moelles normales ($SD_{moy} = 0,37$ pour l'essai IR3039 et $SD_{moy} = 0,83$ pour l'essai IR3040.3) a servi de calibrateur pour cette étude (Table 2.7).

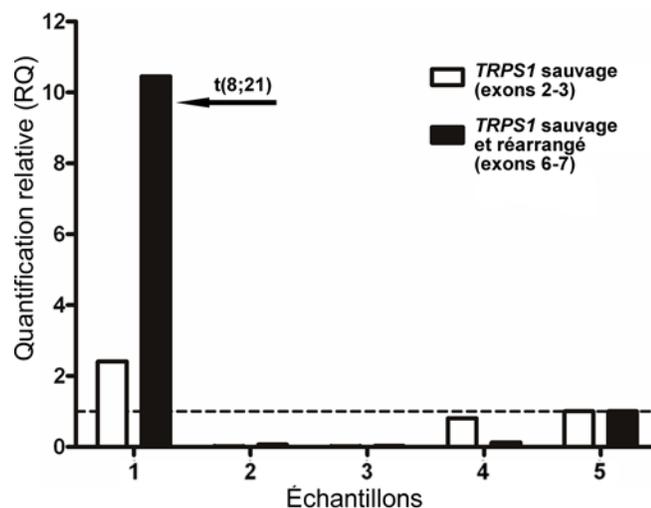


Figure 5.6. Expression différentielle des allèles de *TRPS1*. Une surexpression de l'allèle réarrangé de *TRPS1* (essai Taqman localisé à la jonction des exons 6 et 7 ; colonne foncée) est observée dans les cellules mononuclées du spécimen présentant la $t(8;21)(q23.3;q22)$ (échantillon 1) ($RQ_{t(8;21)} = 10,45$) par rapport à l'échantillon calibrateur (moyenne de trois moelles normales ; échantillon 5). L'allèle sauvage (essai Taqman localisé à la jonction des exons 2 et 3 ; colonne blanche) est également plus exprimé dans les cellules du spécimen présentant la $t(8;21)(q23.3;q22)$ par rapport aux autres échantillons étudiés ayant un caryotype normal (échantillons 2, 3 et 4) ($RQ_{t(8;21)} = 2,41$). Le trait pointillé indique la valeur de 1 attribuée à l'échantillon calibrateur.

L'analyse finale montre une surexpression de l'allèle *TRPS1* réarrangé ($RQ_{t(8;21)} = 10,45$) par rapport à l'allèle *TRPS1* sauvage ($RQ_{t(8;21)} = 2,41$) dans les cellules présentant la $t(8;21)(q23.3;q22)$ (Fig. 5.6). Pour les trois autres échantillons de LAM étudiés, de très faibles valeurs d'expression ont été obtenues ($RQ \leq 0,8$) concordant avec la littérature rapportant une faible expression de *TRPS1* dans la moelle osseuse. De plus, ces résultats suggèrent que *TRPS1* est faiblement exprimé ou est sous-exprimé dans ces leucémies à caryotype normal par rapport à la moelle normale (Fig. 5.6, échantillons 2-4). Les mêmes résultats ont été obtenus avec le second contrôle endogène *TBP*. Suite à cette translocation, les séquences de *TRPS1* sont fusionnées à la région codante de *RUNXI* et sont soumises au contrôle de son promoteur expliquant possiblement la surexpression de l'allèle réarrangé dans ces cellules.

L'activation transcriptionnelle du gène partenaire de *RUNX1* est fréquemment rapportée dans les leucémies avec réarrangements de la bande 21q22 (Hazourli et al., 2006; Guastadisegni et al., 2010; Giguere and Hebert 2011). Ceci a été rapporté pour les allèles réarrangés de *PRDM16*, *USP42*, *CBFA2T2*, *C20orf112* et maintenant *TRPS1*. La surexpression du gène et de la protéine TRPS1 a aussi été décrite dans les cancers du sein et dans certains cancers de la prostate dépendant ou non des androgènes (Chang et al., 2004; Radvanyi et al., 2005). Basé sur ces données, il a été proposé que l'augmentation d'expression de TRPS1 soit un évènement précoce dans le développement du cancer du sein et que cette protéine soit possiblement impliquée dans l'oncogenèse (Radvanyi et al., 2005).

5.6 Mécanismes de leucémogénèse proposés pour la fusion

RUNX1-TRPS1

Les protéines chimériques de fusion RUNX1-TRPS1 prédites conservent le domaine RHD de RUNX1 et acquièrent les domaines GATA et « IKAROS-like » de TRPS1. Dû à la préservation de ces domaines, les chimères RUNX1-TRPS1 sont possiblement capables d'hétérodimérisation avec le CFBF et de liaison à l'ADN au niveau des sites consensus de RUNX1 et de GATA, permettant la dérégulation d'un nombre plus important et varié de cibles. En fait, cette interaction supposée entre l'ADN et la fusion RUNX1-TRPS1 a été démontrée par l'équipe de Asou et collaborateurs à l'aide de la technique EMSA « electrophoretic mobility shift assays » en utilisant des fragments

d'ADN contenant des sites consensus de liaison de RUNX1 et de GATA1 (Asou et al., 2007).

GATA1 est un facteur de transcription clé de l'hématopoïèse qui agit comme un régulateur essentiel de la lignée mégacaryocytaire et érythroïde et qui réalise diverses interactions afin de favoriser la différenciation de ces lignées. Par exemple, une interaction avec SPI1 est décrite afin de favoriser un engagement vers la voie mégacaryocytaire et érythroïde plutôt que vers la différenciation granulocytaire (Burda et al., 2010). Il a aussi été démontré que le domaine en doigt de zinc de la famille GATA de GATA1 interagisse avec le domaine RHD de RUNX1 afin de favoriser la différenciation des mégacaryocytes (Elagib et al., 2003; Xu et al., 2006). Une interaction entre les domaines GATA de TRPS1 et RHD de RUNX1 a aussi été confirmée par Assou et collaborateurs, à l'aide d'une technique d'immunoprécipitation (Asou et al., 2007). La protéine RUNX1-TRPS1 acquiert aussi un potentiel de dimérisation conféré par le domaine « IKAROS-like » de TRPS1 (Asou et al., 2007). Ainsi, Assou et collaborateurs ont proposé que RUNX1-TRPS1 puisse compromettre les fonctions normales de RUNX1 et de GATA1 par une action dominante négative (compétition pour les sites de liaison à l'ADN), par une répression de la capacité transcriptionnelle de RUNX1 et de GATA1 (potentiel répresseur de TRPS1) et par la séquestration des protéines normales RUNX1 et GATA1 par la fusion (pouvoir de dimérisation), empêchant ainsi l'accomplissement des programmes transcriptionnels régulés par ces deux facteurs essentiels au bon fonctionnement de l'hématopoïèse normale (Asou et al.,

2007). Il est donc possible de postuler que RUNX1-TRPS1 puisse agir tel un facteur de transcription aberrant.

Puisque la chimère conserve le domaine RHD qui est responsable d'une interaction avec GATA1 et qu'une interaction entre le RHD et TRPS1 a été démontrée, il nous est possible d'émettre l'hypothèse que la chimère puisse aussi interagir avec GATA1 et que RUNX1-TRPS1 puisse altérer la différenciation des mégacaryocytes et des érythrocytes. En fait, dans des cellules CD34⁺ exprimant la fusion *RUNX1-RUNX1T1*, une interaction entre la chimère et GATA1 a été démontrée, ce qui a pour effet d'empêcher l'acétylation de GATA1 par p300/CBP (Choi et al., 2006). L'acétylation de GATA1 est essentielle afin d'activer la transactivation de ses cibles et de permettre la différenciation des lignées des mégacaryocytes et des érythrocytes (Elagib et al., 2003; Choi et al., 2006). Ainsi, en absence d'acétylation, l'activation des cibles de GATA1 est altérée dans les cellules exprimant la fusion RUNX1-RUNX1T1 menant à des anomalies des lignées érythroïde et mégacaryocytaire chez ces patients (Choi et al., 2006). Le médullogramme du cas présentant la t(8;21)(q23.3;q22) démontrait une importante diminution en nombre des mégacaryocytes et une dysplasie de la lignée érythroïde pouvant possiblement être reliées à une altération des fonctions de GATA1. Toutefois, ces caractéristiques ne sont pas spécifiques à cette translocation et peuvent être retrouvées dans d'autres types de LAM.

De telles anomalies morphologiques ont aussi été observées dans un cas de SMD avec t(X;21)(p22.3;q22) générant une fusion très similaire à RUNX1-TRPS1 puisqu'elle implique le gène *ZFPM2/FOG2* « Friend of GATA2 » codant pour le co-répresseur des facteurs de transcription GATA. Tel que démontré pour la fusion RUNX1-TRPS1, la chimère RUNX1-ZFPM2 est aussi capable d'inhiber le potentiel de transactivation de RUNX1 et de GATA1. Cette chimère conserve un motif PIDLS retrouvé sur ZFPM2 qui respecte la séquence consensus de liaison de CtBP [séquence consensus : PX(D/N)L(S/T)] lui permettant d'interagir avec ce répresseur (Chan et al., 2005). Le recrutement de CtBP a été discuté dans l'introduction comme un important mécanisme de répression de la fusion RUNX1-MECOM. CtBP est également recruté par la protéine IKAROS grâce à un motif PEDLS exprimé dans sa partie N-terminale (Postigo and Dean 1999; Koipally and Georgopoulos 2000). De façon intéressante, un motif similaire, mais non identique à la séquence consensus de liaison de CtBP est exprimé dans le domaine IKAROS-like de TRPS1 (PLDLA). Malgré une divergence par rapport à la séquence consensus décrite, il a été démontré que ce motif interagit aussi fortement avec CtBP (Perdomo and Crossley 2002). De plus, lorsque les acides aminés codant pour ce domaine de TRPS1 sont fusionnés au domaine de liaison à l'ADN de Gal4, cette séquence confère un potentiel de répression transcriptionnelle à Gal4, confirmant la fonction répressive de ce membre unique de la famille GATA (Perdomo and Crossley 2002). Cette hypothèse quant à l'interaction de RUNX1-TRPS1 avec CtBP pourrait appuyer la fonction de facteur de transcription aberrant proposée pour cette fusion.

CHAPITRE 6

6. Étude de la t(15;21)(q26.1;q22)

6.1 Paramètres cliniques du cas 08H131

En décembre 2008, les cellules leucémiques d'une patiente âgée de 43 ans ont été analysées à la BCLQ. Une formule sanguine complète a démontré une hémoglobine normale (123 g/L), un décompte normal de plaquettes à $163 \times 10^9/L$ et un décompte de leucocytes élevé de $83,0 \times 10^9/L$ avec 79 % de blastes positifs pour les marqueurs suivants : MPO cytoplasmique (cyMPO), HLA-DR, CD34, CD33, CD13, TdT, CD19, CD10 et IgM(cy). Une co-expression des marqueurs CD10/CD13 et CD13/CD19 a été détectée dans 37 % et 48 % des blastes respectivement, suggérant l'existence d'une population blastique co-exprimant des marqueurs à la fois myéloïdes et lymphoïdes de la lignée B. L'analyse cytogénétique réalisée sur les cellules mononuclées isolées du sang périphérique a montré un caryotype anormal : $46,XX,t(9;22)(q34;q11.2),?t(15;21)(q26;q22)[20]$ (Fig. 6.1). Une hybridation de la sonde BCR-ABL1 extra signal « dual color translocation probe » a été réalisée sur des cellules de biopsie osseuse, démontrant la présence de la t(9;22)(q34;q11.2) et de la fusion *BCR-ABL1* dans 84,3 % des cellules. Un diagnostic de leucémie aiguë à phénotype mixte (myéloïde/lymphoïde B) (MPAL) avec une t(9;22)(q34;q11.2) a été établi selon les critères de la classification du WHO (Swerdlow et al., 2008).

Une rémission complète a été obtenue avec une chimiothérapie d'induction combinant le protocole CALGB 9111 et l'Imatinib mésylate (Gleevec). Vu l'agressivité de la maladie, la patiente a été référée en 2009 pour une greffe de CSH de type allogénique avec un donneur non apparenté. Elle est demeurée en rémission moléculaire pendant deux années suite à ce traitement. Une rechute moléculaire (transcrits *BCR-ABL1* positifs en qRT-PCR) a cependant été notée en juin 2011 dans les cellules médullaires. Une thérapie avec un inhibiteur de tyrosine kinase de deuxième génération a alors été instaurée.

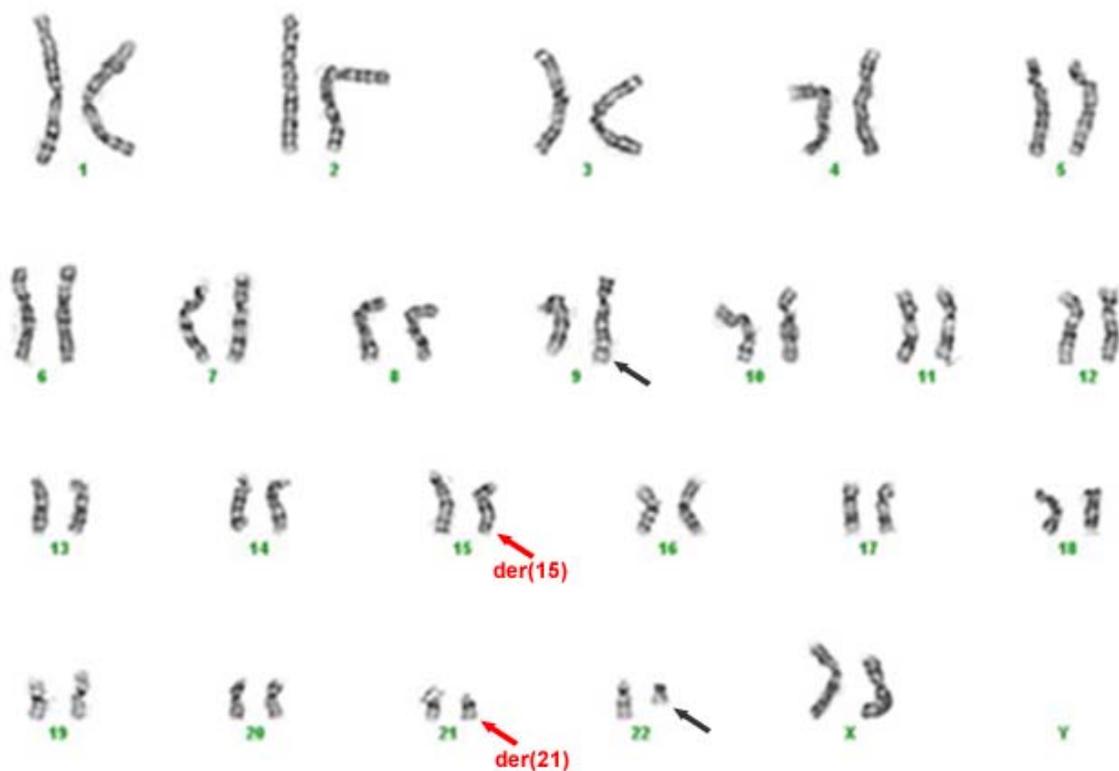


Figure 6.1. Analyse cytogénétique des cellules mononuclées isolées du sang périphérique de la patiente présentant une $t(9;22)(q34;q11.2)$ et une

t(15;21)(q26.1;q22). Les flèches noires indiquent la t(9;22)(q34;q11.2) alors que les flèches rouges indiquent les chromosomes dérivés 15 [der(15)] et 21 [der(21)].

6.2 Analyse cytogénétique

6.2.1 Identification du point de cassure sur le gène *RUNXI*

Le caryotype en bandes G suggérait une translocation semi-cryptique entre les bras longs des chromosomes 15 et 21. Afin de confirmer l'implication de *RUNXI*, nous avons réalisé une technique de FISH avec des sondes BACs sur les cellules mononuclées isolées du sang périphérique de la patiente. Les BACs RP11-100J18 (172 kb), RP11-771C10 (195 kb), RP11-299D9 (139 kb), RP11-17O20 (142 kb) et le fosmide G248P8181C2 (42 kb), couvrant différentes régions du locus de *RUNXI*, ont été utilisés et nous ont permis de délimiter la région de cassure à la bande chromosomique 21q22. L'hybridation de la sonde RP11-299D9 sur des chromosomes métaphasiques a généré deux signaux respectivement localisés sur le chromosome 21 normal et sur le chromosome dérivé 21 [der(21)], suggérant une cassure localisée en position télomérique (Fig. 6.2D). Trois signaux ont été visualisés sur le chromosome 21 normal, sur le der(21) et sur le chromosome dérivé 15 [der(15)] avec la sonde RP11-17O20, couvrant à la fois l'intron 1a/b, l'exon 1a/b, une région télomérique au locus *RUNXI* ainsi que la séquence non-codante *RUNXI-ITI* (Fig. 6.2C). Ce profil typique d'hybridation à trois signaux suggérait une cassure localisée au sein de la région couverte par cette sonde. Afin d'éliminer la possibilité d'un nouveau réarrangement

impliquant la séquence *RUNXI-IT1*, nous avons utilisé le BAC RP11-100J18 couvrant une région télomérique à cette séquence et le fosmide G248P8181C2, localisé dans l'intron 1b de *RUNXI* et ciblant une région centromérique à *RUNXI-IT1* (Fig. 6.2F). Un signal localisé sur le chromosome 21 normal et un second signal localisé sur le der(15) ont été observés pour chacune des sondes ciblant ces régions de part et d'autre de *RUNXI-IT1*, indiquant un point de cassure centromérique localisé dans l'intron 1b de *RUNXI* (Figs. 6.2A-6.2B). À l'aide de cette stratégie, nous avons éliminé la possibilité d'un réarrangement impliquant la séquence non-codante *RUNXI-IT1* et avons confirmé la présence d'une cassure localisée au sein de l'intron 1b de *RUNXI*. La cassure en 21q22 se situe probablement à l'intérieur d'une région d'environ 50 kb de l'intron 1b laquelle est couverte par le BAC RP11-17O20, mais non incluse dans le fosmide G248P8181C2 (Fig. 6.2F). Il est important de noter qu'un signal correspondant possiblement à une partie de l'intron 1b ainsi qu'aux exons 2 à 8 de l'allèle *RUNXI* réarrangé a été détecté sur le der(21) lors de l'hybridation de la sonde RP11-299D9, indiquant que ces exons des transcrits *RUNXIb/a* puissent s'exprimer dans ces cellules présentant la t(15;21)(q27.1;q22).

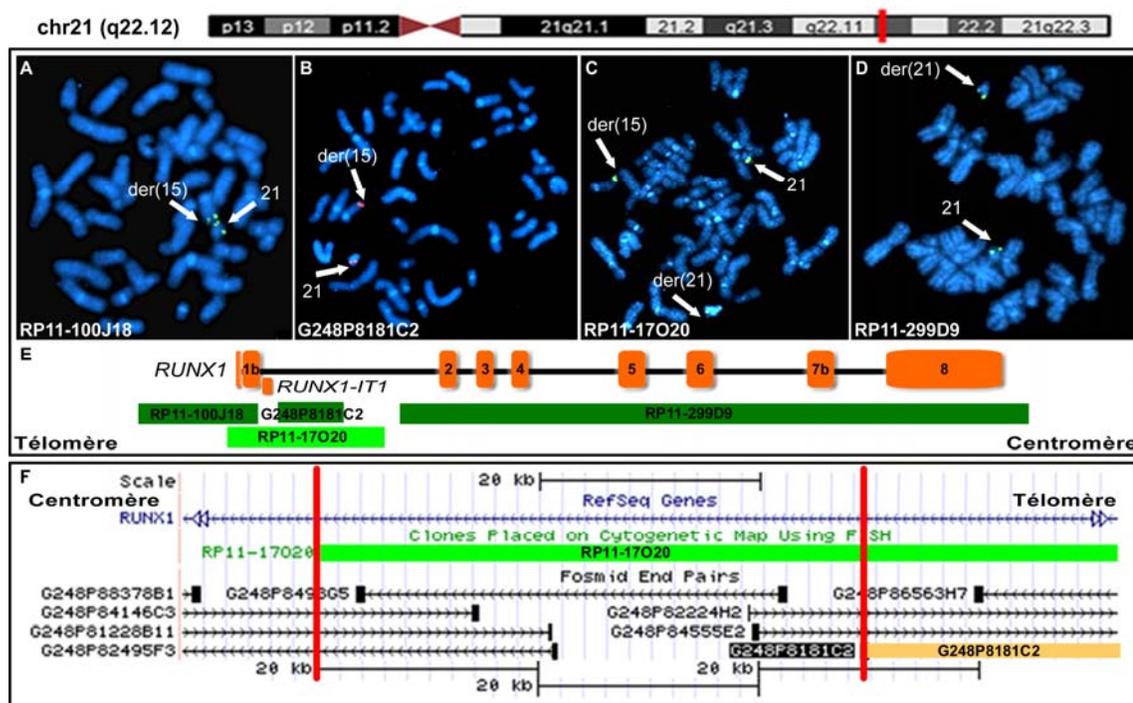


Figure 6.2. Hybridation *in situ* en fluorescence des sondes ciblant le locus de *RUNX1* sur les chromosomes métaphasiques obtenus à partir des cellules mononuclées isolées du sang périphérique du spécimen présentant la $t(15;21)(q26.1;q22)$. (A) Hybridation de la sonde BAC RP11-100J18 montrant la présence de deux signaux respectivement localisés sur le chromosome 21 normal et sur le chromosome dérivé 15 [der(15)]. (B) Hybridation de la sonde fosmide G248P8181C2 montrant la présence de deux signaux respectivement localisés sur le chromosome 21 normal et sur le der(15). Ce résultat suggère la présence d'une cassure en position centromérique à la région couverte par cette sonde. (C) Hybridation du BAC RP11-17O20 montrant la présence de trois signaux respectivement localisés sur le chromosome 21 normal et sur les chromosomes dérivés 21 [der(21)] et der(15). Un profil d'hybridation à trois signaux indique la présence d'une cassure localisée au sein de la région couverte par cette sonde. (D) Hybridation de la sonde BAC RP11-299D9 montrant la présence de deux signaux respectivement localisés sur le chromosome 21 normal et sur der(21). Ce résultat suggère la présence d'une cassure en position télomérique à la région couverte par cette sonde. (E) Positionnement des sondes BACs

et fosmides utilisées à la bande chromosomique 21q22.12. (F) Positionnement de la sonde BAC RP11-17O20 et du fosmide G248P8181C2 par rapport à la région de cassure proposée d'environ 50 kb, localisée dans l'intron 1b de *RUNXI*. Les deux traits rouges, n'incluant pas la séquence non-codante *RUNXI-IT1*, délimite la région de cassure suggérée.

6.2.2 Identification du gène partenaire de la t(15;21)(q26;q22)

À l'aide des caryotypes en bandes G, la bande chromosomique 15q26 et la sous-bande 15q26.3 ont d'abord été étudiées par FISH en utilisant une variété de sondes BACs. Puisqu'aucun partenaire connu de *RUNXI* n'était identifié dans cette région chromosomique, nous avons opté pour une stratégie de marche sur le chromosome. L'hybridation sur des chromosomes métaphasiques des sondes BAC RP11-90E5 (15q26.3) et RP11-337N12 (15q26.2) a révélé un même profil d'hybridation suggérant un point de cassure en position centromérique, avec un signal sur le chromosome 15 normal et un second signal sur le der(21). L'utilisation des sondes BACs RP11-378B5, RP11-661P17, RP11-345O16, RP11-24J19, RP11-615N7, RP11-113M15 et RP11-79A7, couvrant différents loci de la bande chromosomique 15q26.1, a cependant permis de délimiter la région de cassure (Table 6.1).

Sonde	Position	Gène	chr21	der(21)	der(15)	chr15	Délétion
<i>Région chromosomique 21q22</i>							
G248P8181C2	21q22.12	<i>RUNX1</i>	x		x		
RP11-100J18	21q22.12	<i>RUNX1</i>	x		x		
RP11-17020	21q22.12	<i>RUNX1</i>	x	x	x		
RP11-299D9	21q22.12	<i>RUNX1</i>	x	x			
RP11-771C10	21q22.12	<i>RUNX1</i>	x	x			
<i>Région chromosomique 15q26</i>							
RP11-90E5	15q26.3	<i>ADAMTS17</i>		x		x	
RP11-337N12	15q26.2	<i>NR2F2</i>		x		x	
RP11-369O17	15q26.1	<i>RGMA</i>		x		x	
RP11-79A7	15q26.1	<i>ST8SIA2</i>		x		x	
RP11-113M15	15q26.1	<i>SLCO3A1</i>				x	x
RP11-615N7	15q26.1	<i>SLCO3A1</i>				x	x
RP11-24J19	15q26.1	<i>SLCO3A1</i>				x	x
RP11-345O16	15q26.1	-				x	x
RP11-661P17	15q26.1	-				x	x
RP11-378B5	15q26.1	<i>SV2B</i>			x	x	
RP11-360F18	15q26.1	<i>CRTC3, BLM</i>			x	x	

Table 6.1. Sondes BACs et fosmidés utilisées afin d'identifier les deux régions de cassures aux bandes chromosomiques 21q22 et 15q26.1. Les résultats d'hybridation *in situ* en fluorescence sont indiqués, indiquant la position des signaux fluorescents sur chaque chromosome impliqué dans la t(15;21)(q26.1;q22). chr21, chromosome 21 normal ; der(21), chromosome dérivé 21 ; der(15), chromosome dérivé 15 ; chr15, chromosome 15 normal ; Délétion, sonde incluse dans la région de délétion en 15q26.1.

L'hybridation de la sonde RP11-378B5, couvrant la région la plus centromérique de la bande 15q26.1 (gène *SV2B*), a généré deux signaux respectivement localisés sur le chromosome 15 normal et sur le der(15), indiquant un point de cassure en position télomérique (Fig. 6.3A). L'hybridation de la sonde RP11-79A7, couvrant une région plus télomérique (portion centromérique du gène *ST8SIA2*), a produit deux signaux localisés sur le chromosome 15 normal et sur le der(21), suggérant un point de cassure plutôt centromérique (Fig. 6.3G). Ces résultats indiquaient alors la présence d'un point

de cassure localisé entre les régions couvertes par ces deux BACs, région délimitée par les exons centromériques du gène *SV2B* et par les exons télomériques du gène *ST8SIA2*. De façon intéressante, un seul signal localisé sur le chromosome 15 normal a été généré lors de l'hybridation de chacune des cinq sondes localisées entre ces deux derniers BACs (RP11-661P17, RP11-345O16, RP11-24J19, RP11-615N7 et RP11-113M15), indiquant la présence d'une large délétion d'environ 1 mégabase (Mb) ciblant le gène situé entre *SV2B* et *ST8SIA2*, soit le gène *SLCO3A1* (Figs. 6.3B-6.3F, 6.3I). Il est à noter que nous n'avons pas observé de signal divisé pour aucune des sondes utilisées dans cette région, incluant celles couvrant les gènes *SV2B* (RP11-378B5), *SLCO3A1* et *ST8SIA2*. Dû à l'absence d'un profil d'hybridation à trois signaux, il nous a été impossible d'identifier le point de cassure exact de la bande 15q26.1 à l'aide de cette méthode. De plus, il n'est pas exclu qu'un plus petit signal généré par la sonde RP11-378B5 (*SV2B*) ou RP11-79A7 (*ST8SIA2*) n'ait pas été visualisé en raison de la limite de résolution de la technique FISH. En résumé, ces profils d'hybridation proposaient que la région de cassure soit délimitée par les BACs RP11-378B5 et RP11-79A7 de la bande chromosomique 15q26.1 (Figs. 6.3A-6.3G). De plus, ces résultats suggéraient que les séquences centromériques de *SV2B* puissent demeurer sur le der(15) alors que le gène *ST8SIA2* soit transloqué sur le der(21), nous permettant de proposer que l'intron 1b de *RUNX1* puisse être fusionné ou déplacé à proximité des séquences centromériques du gène *SV2B* sur le der(15) (Fig. 6.4).

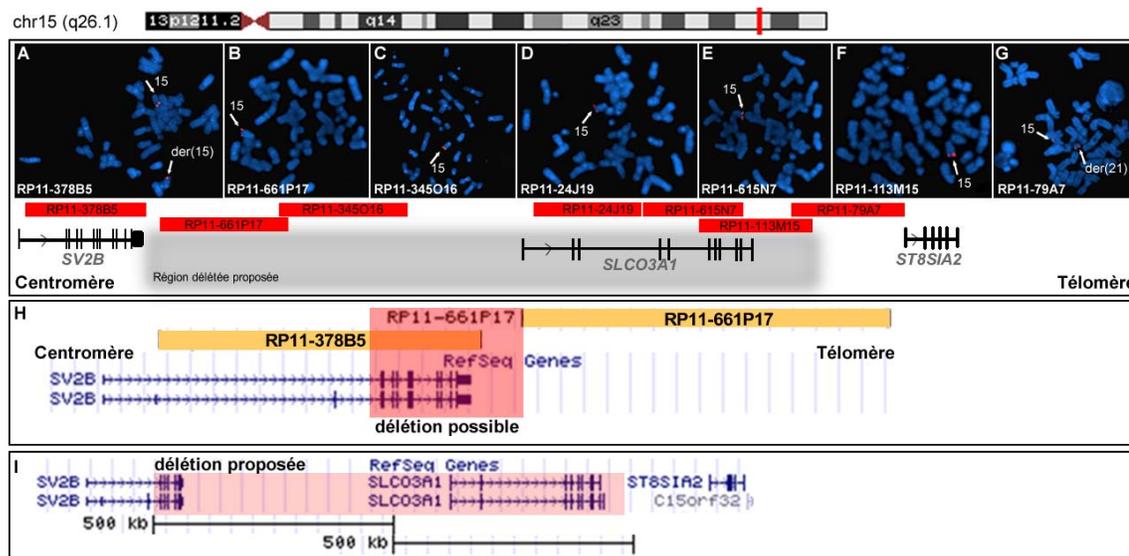


Figure 6.3. Hybridation *in situ* en fluorescence des sondes BACs ciblant le locus 15q26.1 sur les chromosomes métaphasiques obtenus à partir des cellules mononuclées du sang périphérique de la patiente présentant la t(15;21)(q26.1;q22). (A) Hybridation de la sonde BAC RP11-378B5 montrant la présence de deux signaux respectivement localisés sur le chromosome 15 normal et sur le chromosome dérivé 15 [der(15)]. (B) Hybridation de la sonde BAC RP11-661P17 montrant la présence d'un seul signal localisé sur le chromosome 15 normal. (C) Hybridation de la sonde BAC RP11-345O16 montrant la présence d'un seul signal localisé sur le chromosome 15 normal. (D) Hybridation de la sonde BAC RP11-24J19 montrant la présence d'un seul signal localisé sur le chromosome 15 normal. (E) Hybridation de la sonde BAC RP11-615N7 montrant la présence d'un seul signal localisé sur le chromosome 15 normal. (F) Hybridation de la sonde BAC RP11-113M15 montrant la présence d'un seul signal localisé sur le chromosome 15 normal. (G) Hybridation de la sonde BAC RP11-79A7 montrant la présence de deux signaux respectivement localisés sur le chromosome 15 normal et sur le chromosome dérivé 21 [der(21)]. (H) Positionnement des sondes BACs RP11-378B5 et RP11-661P17 par rapport au gène *SV2B*. La sonde RP11-661P17 est incluse dans la région ciblée par la délétion. En raison du point de cassure identifié par la technique de 3'RACE PCR, les exons télomériques du gène *SV2B* sont possiblement

inclus dans cette large délétion (délétion possible en rouge). (I) Taille approximative de la délétion identifiée à la bande chromosomique 15q26.1 (~1 Mb ; en rouge).

6.3 Étude des transcrits de fusion *RUNX1-SV2B*

Pour qu'un ARNm de fusion soit exprimé, les deux gènes ou séquences qui sont fusionnés doivent conserver une même orientation de transcription. L'analyse de la région de cassure à la bande 15q26.1 nous a permis d'établir que les gènes *SV2B* et *ST8SIA2* ne respectaient pas l'orientation télomère vers centromère du gène *RUNX1*. Ainsi, *SV2B* et *ST8SIA2* possèdent une orientation inversée à *RUNX1* (centromère vers télomère) rendant peu probable l'expression d'un transcrit de fusion impliquant l'un de ces gènes. En raison de l'existence d'une délétion ciblant *SLCO3A1* et des résultats de FISH suggérant la translocation complète du gène *ST8SIA2* sur le der(21), la région du gène *SV2B* a davantage été étudiée. Puisque la sonde BAC ciblant *SV2B* n'a pas généré de signal sur le der(21) (Fig 6.3A), les deux possibilités suivantes ont été évaluées :

- 1) le point de cassure est localisé à l'extérieur de *SV2B*, en position télomérique au gène (Fig. 6.3H). Dans cette situation, la translocation pourrait permettre une fusion entre l'exon 1b de *RUNX1* et de l'ADN génomique (chr15q26.1) sur le der(15) et une fusion réciproque entre l'ADN génomique de la bande 15q26.1 et l'exon 2 de *RUNX1* sur le der(21).
- 2) le point de cassure est localisé dans le gène *SV2B* et le signal résiduel est soit trop petit pour être perçu en FISH ou inclus dans la délétion (Fig. 6.3H). Dans

cette situation, l'exon 1b de *RUNXI* est fusionné aux exons centromériques de *SV2B* sur le der(15) alors que les exons télomériques de *SV2B* (possiblement délétés) ou plus probablement de l'ADN génomique en position télomérique à *SLCO3A1* est fusionné à l'exon 2 de *RUNXI* sur le der(21) (Fig. 6.4).

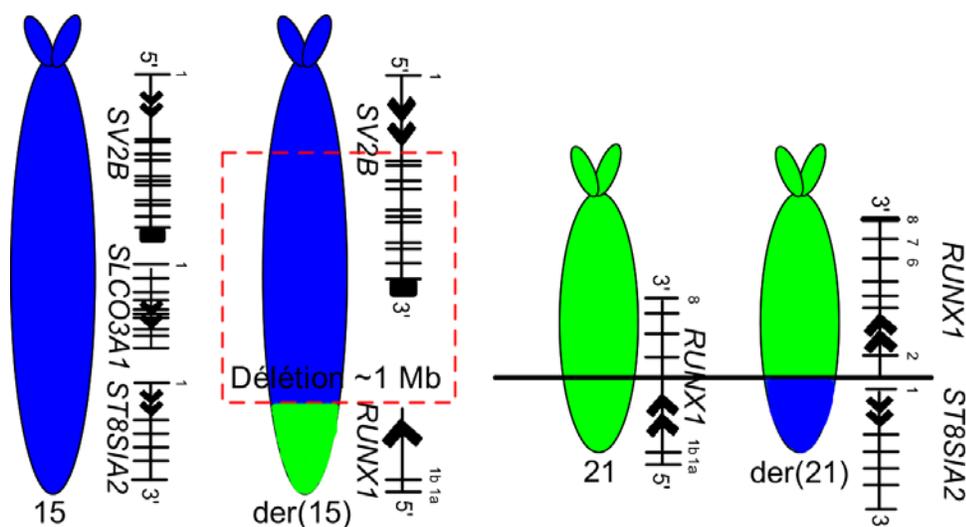


Figure 6.4. Modèle de la t(15;21)(q26.1;q22). Les gènes *SV2B*, *SLCO3A1* et *ST8SIA2* ainsi que le gène *RUNXI* sont respectivement représentés sur le chromosome 15 normal et sur le chromosome 21 normal. Lors de cette t(15;21)(q26.1;q22), les exons 1a et 1b de *RUNXI* sont transloqués puis fusionnés aux séquences centromériques de *SV2B* (intron 1) sur le chromosome dérivé 15 [der(15)]. En contrepartie, le gène *ST8SIA2* ou l'ADN génomique localisé en position télomérique à *SLCO3A1* (ou centromérique à *ST8SIA2*) est déplacé sur le chromosome dérivé 21 [der(21)] et possiblement fusionné à l'exon 2 de *RUNXI* alors que les exons plus télomériques de *SV2B* sont possiblement inclus dans la délétion.

Tel que mentionné dans le chapitre 4, trois fusions impliquant *RUNXI* avec des régions d'ADN génomique en position 5q13.3, 10q22.1 et 17q21 ont récemment été identifiées

dans une seule étude grâce à l'utilisation des technologies de séquençage de nouvelle génération (Grossmann et al., 2011b). Ces fusions ne permettent pas l'expression d'un ARNm de fusion et certaines n'expriment que la forme réciproque (*chr5-RUNXI* et *chr17-RUNXI*), nécessitant des analyses par PCR sur de l'ADN génomique afin de les détecter et de les séquencer. Une seule autre fusion de *RUNXI* avec de l'ADN génomique d'un gène encore non identifié (*RUNXI-chr9q34.3*) a été étudiée par d'autres méthodes, incluant la technique de RACE PCR. Dans ce dernier cas, un transcrit de fusion entre l'exon 4 de *RUNXI* et de l'ARNm d'un gène encore inconnu en 9q34.3 était exprimé (Agerstam et al., 2007).

Basé sur les deux hypothèses présentées, aucun ARNm de fusion n'est attendu pour ces deux situations. Afin d'évaluer la présence ou non d'ARNm de fusion entre l'exon 1b de *RUNXI* et les séquences centromériques de *SV2B*, nous avons entrepris une technique de 3'RACE PCR à l'aide d'amorces sens localisées dans les exons 1a et 1b de *RUNXI* (*RUNX1_ex1aF* ; *RUNX1_ex1bF* ; *RUNX1_ex1bF2*) (Table 2.7). Les PCR ont été réalisées à l'aide de l'ensemble « Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity » de Invitrogen, selon les conditions décrites à la section 2.4.3. Nous avons également investigué la possibilité d'une fusion réciproque *chr15q26.1-RUNXI* exon 2 à l'aide d'une technique de 5'RACE PCR et d'amorces anti-sens localisées à la jonction des exons 2 et 3 (*RUNX1_2,3R*) ou dans l'exon 4 de *RUNXI* (*RUNX1_4R*) (Table 2.7).

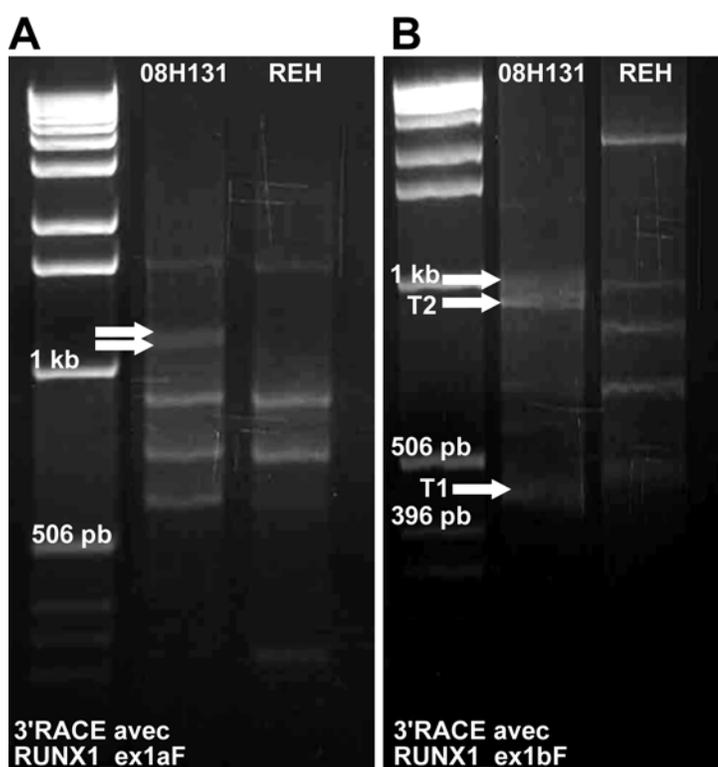


Figure 6.5. Migration sur gel d'agarose des produits d'amplification des techniques de 3'RACE PCR. (A) Produits d'amplification de la 3'RACE réalisée sur les ADNc de la patiente 08H131 présentant la $t(15;21)(q26.1;q22)$ et de la lignée de LAL-B REH présentant une $t(12;21)(p13;q22)$ à l'aide de l'amorce *RUNX1_ex1aF* montrant deux bandes d'un poids supérieur à 1 kb absentes de la lignée REH. (B) Produits d'amplification de la 3'RACE réalisée à l'aide de l'amorce *RUNX1_ex1bF* montrant trois bandes d'un poids d'environ 1 kb, 950 pb (T2) et 450 pb (T1) absentes de la lignée REH.

La technique de 3'RACE PCR nous a permis de mettre en évidence trois bandes spécifiquement exprimées dans les cellules du cas 08H131. Le séquençage de deux de ces bandes, ayant un poids d'environ 950 pb et d'environ 450 pb, nous a permis d'identifier des fusions entre l'exon 1b de *RUNX1* et des séquences de l'intron 1 du brin

anti-sens de *SV2B* (Figs. 6.5A-6.5B). Le brin anti-sens de *SV2B* est porteur des séquences complémentaires au brin codant et possède une orientation inversée 3'-5' par rapport au brin codant. Lors de la t(15;21)(q26.1;q22), les exons 1a et 1b de *RUNXI* sont transloqués sur le chromosome 15 et fusionnés à l'intron 1 de *SV2B*. La transcription du brin d'ADN codant de *RUNXI* semble se poursuivre sur le brin anti-sens de *SV2B* lequel possède la même orientation de transcription que *RUNXI* permettant l'expression d'au moins deux transcrits d'ARNm matures détectés par la 3'RACE (Figs. 6.5A-6.5B ; 6.6A-6.6B). Cependant, la technique de 5'RACE n'a pas révélé de différence entre les profils d'amplification des cellules de la patiente avec la t(15;21)(q26.1;q22) et les cellules de la lignée REH à l'aide d'une amorce ciblant soit la jonction des exons 2 et 3 ou l'exon 4 de *RUNXI* (données non présentées), suggérant que la fusion réciproque ne soit pas exprimée sous forme d'ARNm de fusion ou que cette dernière ne soit pas détectée à l'aide des amorces utilisées. Ces résultats de 3'RACE ont été confirmés par des PCR sur de l'ADNc à l'aide de l'ensemble « Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity » de Invitrogen et d'amorces sens *RUNXI_ex1aF* ou *RUNXI_ex1bF* et anti-sens *SV2B_int1AS*, *SV2B_int1AS1*, *SV2B_int1AS2* ou *SV2B_int1AS3* localisées dans l'intron 1 du brin anti-sens de *SV2B* (Table 2.6). Les conditions spécifiques suivantes ont été utilisées : 2 minutes de dénaturation initiale à 94°C puis 35 cycles de 30 secondes à 94°C, de 30 secondes à 60°C et de 2 minutes à 68°C.

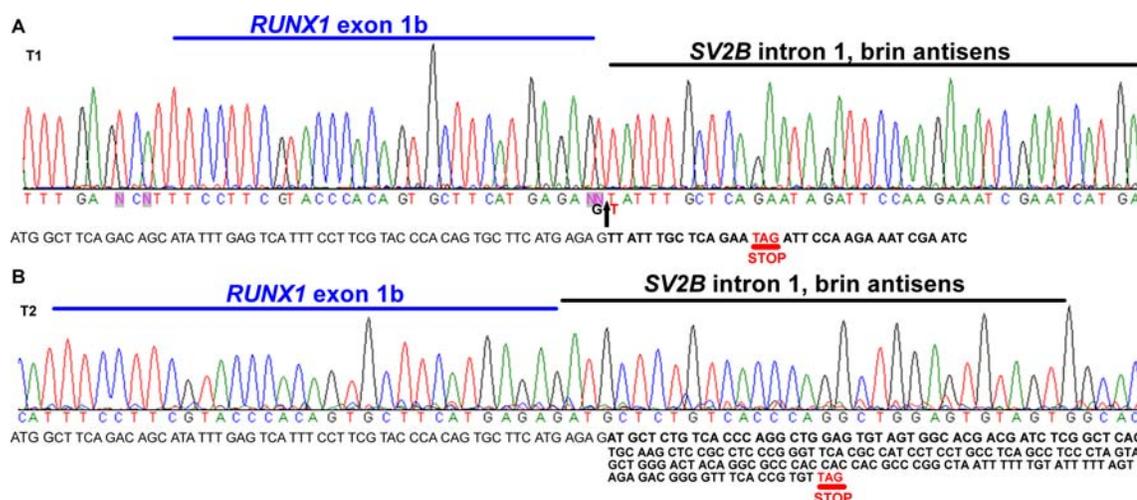


Figure 6.6. Séquences des transcrits de fusion *RUNX1-SV2B* identifiés par PCR sur l'ADN complémentaire du cas 08H131 présentant la t(15;21)(q26.1;q22). (A) Séquençage partiel du transcrit T1 montrant une fusion entre l'exon 1b de *RUNX1* et le brin anti-sens de l'intron 1 de *SV2B* (séquence en gras). Le cadre de lecture est représenté à l'aide des triplets de nucléotides et le codon stop prématuré est marqué en rouge (séquence TAG). La flèche indique le point de jonction. (B) Séquençage partiel du transcrit T2 montrant une fusion entre l'exon 1b de *RUNX1* et le brin anti-sens de l'intron 1 de *SV2B* (séquence en gras). Le cadre de lecture est représenté à l'aide des triplets de nucléotides et le codon stop prématuré est marqué en rouge (séquence TAG).

Ce phénomène de fusion avec un brin anti-sens n'a été rapporté qu'une seule fois à notre connaissance dans un cas de LAM avec t(12;17)(p13;p13) impliquant l'exon 1 de *ETV6* (télomère-centromère) et les séquences du brin anti-sens de l'intron 22 du gène *PER1* (centromère-télomère) (Murga Penas et al., 2003). Cette fusion a également été détectée par 3'RACE et aucun produit de fusion réciproque n'a été observé par 5'RACE dans ces cellules. Pour la fusion principale *ETV6-PER1* brin anti-sens, aucune protéine de fusion n'était attendue, tel que suggéré par ces auteurs (Murga Penas et al., 2003).

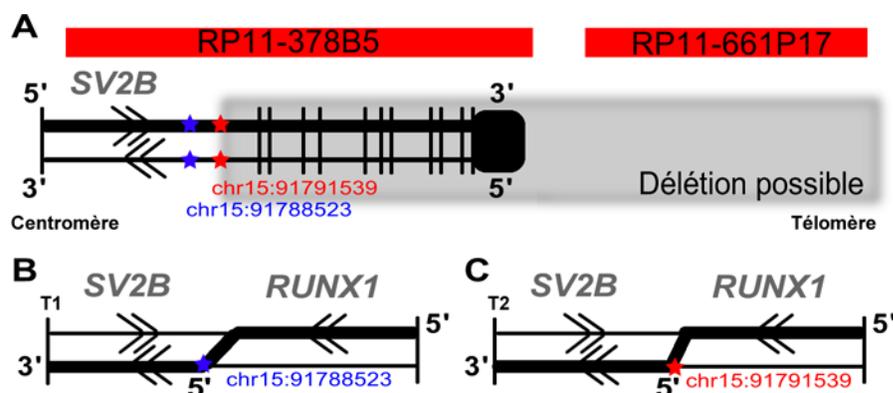


Figure 6.7. Représentation schématique des points de cassure et des transcrits de fusion *RUNX1-SV2B* brin anti-sens. (A) Le point de cassure est situé à l'intérieur de la région couverte par la sonde BAC RP11-378B5. Puisqu'aucun signal n'a été observé sur le chromosome dérivé 21 lors de l'hybridation de la sonde RP11-278B5, les exons télomériques de *SV2B* sont possiblement inclus dans la délétion. La position des deux points de fusion est indiquée par un astérisque (bleu, T1 ; rouge, T2). (B) Représentation du transcrit T1 et de son point de cassure (astérisque bleue). (C) Représentation du transcrit T2 et de son point de cassure (astérisque rouge). chr15, chromosome 15

Chez la patiente 08H131, deux transcrits de fusion *RUNX1-SV2B* ont été séquencés. Dans le premier transcrit (T1, ~450 pb), le dernier nucléotide de l'exon 1b de *RUNX1* est fusionné au nucléotide en position 91788523 de la bande chromosomique 15q26.1 (chr15: 91788523, T sur le brin anti-sens). Dans le second transcrit (T2, ~950 pb), le dernier nucléotide de l'exon 1b de *RUNX1* est fusionné au nucléotide en position 91791539 de la bande chromosomique 15q26.1 (chr15: 91791539, A sur le brin anti-sens). De façon similaire au cas rapporté par Murga Penas et collaborateurs, aucune protéine chimérique de fusion n'est attendue pour cette translocation. Nous croyons plutôt que le concept d'isoforme tronquée de *RUNX1* s'applique, tel que discuté dans le

chapitre 4 pour la t(1;21)(p22;q22). Dans cette situation, le cadre de lecture de *RUNXI* est modifié lorsque les séquences de l'intron 1 du brin anti-sens de *SV2B* y sont fusionnées. Le cadre de lecture de l'exon 1b de *RUNXI* débute au nucléotide 60 [A] et permet l'expression d'un nucléotide G seul à la fin de l'exon 1b lequel est fusionné aux positions 91788523 et 91791539 sur le chromosome 15q26.1 (brin anti-sens). Ces deux formes favorisent l'apparition de codons STOP prématurés au sein de la séquence de l'intron 1 anti-sens de *SV2B* et permettent l'ajout de cinq (transcrit T1) ou de 60 acides aminés (transcrit T2) aléatoires non apparentés aux séquences protéiques normales de *RUNX1* ni de *SV2B* (Figs. 6.6A-6.6B).

6.4 Le gène *SLCO3A1*, un transporteur soluble des ions organiques

La délétion identifiée dans cette t(15;21)(q26.1;q22) couvre *SLCO3A1*, un gène codant pour un transporteur soluble des ions organiques. Les transporteurs d'anions organiques (OATP) représentent des polypeptides multispécifiques indépendants du sodium lesquels sont exprimés dans une variété de tissus des vertébrés. Plus de 36 membres de cette famille ont été identifiés chez l'humain, le rat et la souris et ces membres ont été classifiés dans la superfamille des « solute carrier » (SLCO) incluant 6 familles (SLCO1 à SLCO6) et 13 sous-familles (SLCO1A à SLCO6D).

Le gène *SLCO3A1* (anciennement *OATP-D*) possède 11 exons et s'exprime en deux isoformes de 10 ou de 11 exons lesquels diffèrent selon leurs extrémités 3'. Identifiée en 2003, la protéine *SLCO3A1* a été décrite tel un transporteur à 12 passages transmembranaires favorisant le passage de plusieurs oligopeptides incluant des hormones thyroïdiennes (T4), des diurétiques (vasopressine), des prostaglandines (PGE1, PGE2) et certains dérivés opioïdes (deltorphine II) (Adachi et al., 2003; Huber et al., 2007). Une expression de *SLCO3A1* est détectée dans les testicules, le cœur, les poumons, la rate, les reins, les leucocytes, les ovaires, la glande thyroïde et dans différentes régions du cerveau (Huber et al., 2007). Dans les lignées de cancers, *SLCO3A1* s'exprime dans les lignées HL-60, MOLT-4, K562, Raji et dans une variété de lignées de tumeurs solides (Adachi et al., 2003). Malgré un rôle important prédit par sa conservation interespèce durant l'évolution chez le mammifère, aucune fonction n'est connue à ce jour pour *SLCO3A1* (Adachi et al., 2003).

6.5 Études d'expression du gène *SLCO3A1* dans les tissus hématopoïétiques normaux et leucémiques

Les délétions associées aux translocations [par exemple : t(9;22)(q34;q11.2) et t(12;21)(p13;q22)] sont fréquentes et affectent plusieurs gènes dont *IKZF1*, *CDKN2A/P16*, *PAX5* ou *ETV6* (Mullighan et al., 2008; Paulsson et al., 2008). Afin de vérifier si la délétion de *SLCO3A1* est un évènement pathologique récurrent, nous avons hybridé la sonde BAC RP11-615N7 (*SLCO3A1* exons 3-9) sur les chromosomes

métaphasiques de huit cas de MPAL de la BCLQ avec ou sans t(9;22)(q34;q11.2) (Table 6.2). Or, ces analyses par FISH n'ont révélé aucune délétion. Le nombre de cas étudiés étant restreint, nous avons complété ces analyses par une recherche dans les bases de données de délétions et de CNV « copy number variation » (http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/large_deletion.shtml; <http://projects.tcag.ca/cgi-bin/variation/gbrowse/hg19/>). Il est à noter que des insertions/délétions (indels de moins de 100 pb à moins de 1 kb) ont été répertoriées au sein du gène *SLCO3A1* chez au moins neuf individus normaux. Puisque la délétion détectée dans notre cas est de grande taille comparativement aux indels, cette hypothèse est moins probable. Toutefois, cette délétion pourrait représenter un variant de structure se retrouvant dans l'ADN normal de la patiente ou pourrait être de nature pathologique, au même titre que les délétions des séquences au niveau du chromosome dérivé 9 associées à la t(9;22)(q34;q11.2) chez certains patients.

BCLQ	Tissu	% blastés	Caryotype
03H072	moelle	80	46.XY,t(1:9)(p3?3;q32).der(5:17)(a10;p10).+del(5)(a13).del(12)(p13).-17[22]/46.XY[11]
03H085	moelle	84	45.XX.-7.t(9:22)(a34;q11.2)[16]/46.XX[5]
04H104	moelle	92	46.XY[20]
05H074	moelle	96	47,XY,der(9)del(9)(p10)t(9:22)(q34;q11.2).+14[21]
05H153	moelle	90	45-49,XY,der(2;14)(q10;q10).+der(2;14)(p10;p10).add(5)(p13).add(6)(q21).-7,+8,t(9:22)(q34;q11.2).+9,+10,+?12.add(14)(q32).+add(14)(q32).add(20)(q12).-20.+mar1.inclcp17/46.XY[4]
07H084	moelle	72	45.XY.-7.t(9:22:12)(a34;q11.2:p13)[21]/46.XY[11]
08H123	moelle	83	46,XY,t(9:22)(q34;q11.2)[15]/48,XY,t(9:22)(q34;q11.2).+10,+der(22)t(9:22)(q34;q11.2)[3]/48.XY,t(9:22)(a34;q11.2).add(9)(a12).+10.+der(22)t(9:22)(a34;q11.2)[6]
08H126	moelle	73	46.XX.t(9:22:6)(a34;q11.2:p25)[24]
08H131	sang	79	46.XX,t(9:22)(a34;q11.2).t(15:21)(a26.1;q22)[20]

Table 6.2. Caryotypes des neuf spécimens de leucémie aiguë à phénotype mixte étudiés par hybridation *in situ* en fluorescence. Le tissu évalué et le pourcentage de

blastés sont indiqués pour chaque patient étudié à l'aide de la sonde RP11-615N7 ciblant les exons 3 à 9 de *SLCO3A1*.

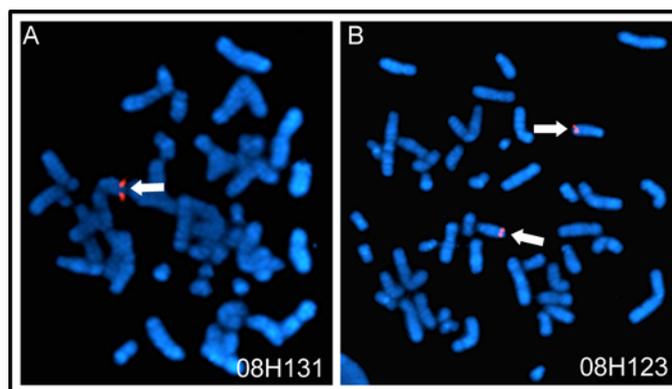


Figure 6.8. Hybridation *in situ* en fluorescence sur les chromosomes métaphasiques de spécimens atteints de leucémie aiguë à phénotype mixte, à l'aide de la sonde RP11-615N7 ciblant les exons 3 à 9 du gène *SLCO3A1*. (A) Métaphase représentative du spécimen 08H131 avec la $t(15;21)(q26.1;q22)$ montrant un seul signal localisé sur le chromosome 15 normal, suggestif d'une délétion du gène *SLCO3A1*. (B) Métaphase représentative du spécimen 08H123 montrant deux signaux localisés sur les chromosomes 15.

Afin de mieux étudier le profil d'expression de *SLCO3A1* dans les leucémies, des lignées de LAM (OCI-AML3, MONO-MAC1, Kasumi-1 et HL-60), de LMC-PB (K562) et des échantillons de sang périphérique d'un donneur sain et de seize patients atteints de leucémies aiguës primaires ayant des morphologies (LAL-B, $n=3$; MPAL, $n=4$; LPA, $n=3$; LAM M5, $n=3$; LAM M1, $n=3$) et des caryotypes variés (caryotype normal, $n=8$; $t(9;22)(q34;q11.2)$, $n=4$; $t(15;17)(q24;q21)$, $n=3$; trisomie 8, $n=1$; $del(1)(p13)$, $n=1$) ont été évalués à l'aide de l'ensemble « HotStar HiFidelity » de Qiagen et des amorces ciblant les exons 7 et 10 de *SLCO3A1*

(*SLCO3A1_ex7F*, 5'ATCACCTACCTGTCTGCCTGCTTT; *SCLO3A1_ex10R*, 5'ACACCACTCATGGTCTTCCAGGTT). Un produit d'amplification spécifique de 639 pb a été détecté dans ces spécimens. Une étude de qRT-PCR a également été réalisée sur quatre spécimens de MPAL avec t(9;22)(q34;q11.2) incluant le spécimen 08H131, la lignée REH avec fusion *ETV6-RUNX1* et trois spécimens de moelle osseuse de donneurs sains (07H088, 07H140, 09H007) à l'aide d'un essai ciblant la jonction des exons 2 et 3 de *SLCO3A1* (IR3045, 5'GTCTCCTACATCGACGACCAC et 5'AATACCAGCATCGTGAACAGG avec la sonde UPL#69) (Table 2.7 ; annexe, table 9.9). La moyenne des trois spécimens de moelle normale et les gènes *HPRT* et *TBP* ont servis de calibrateur et de contrôles endogènes respectivement (Table 2.7). Puisque la déviation standard des valeurs de delta Ct était moindre avec le contrôle *TBP*, celui-ci a été retenu pour l'analyse finale.

Nos résultats de PCR montrent une expression hétérogène de *SLCO3A1* dans les lignées de leucémies (Fig. 6.9A) ainsi que dans les spécimens de leucémies primaires. Nous rapportons une très faible/absence d'expression de *SLCO3A1* dans les lignées MONO-MAC1, Kasumi-1 et K562 et une forte expression dans les spécimens de LAM M1 et de M5 étudiés (Figs. 6.9A-6.9C). Une faible expression a été détectée dans les échantillons de LAL-B, de LPA et de MPAL (Figs. 6.9B-6.9C). Malgré la délétion d'un allèle de *SLCO3A1*, une expression a été détectée dans les cellules du cas 08H131 avec la t(15;21)(q26.1;q22) (Fig. 6.9B).

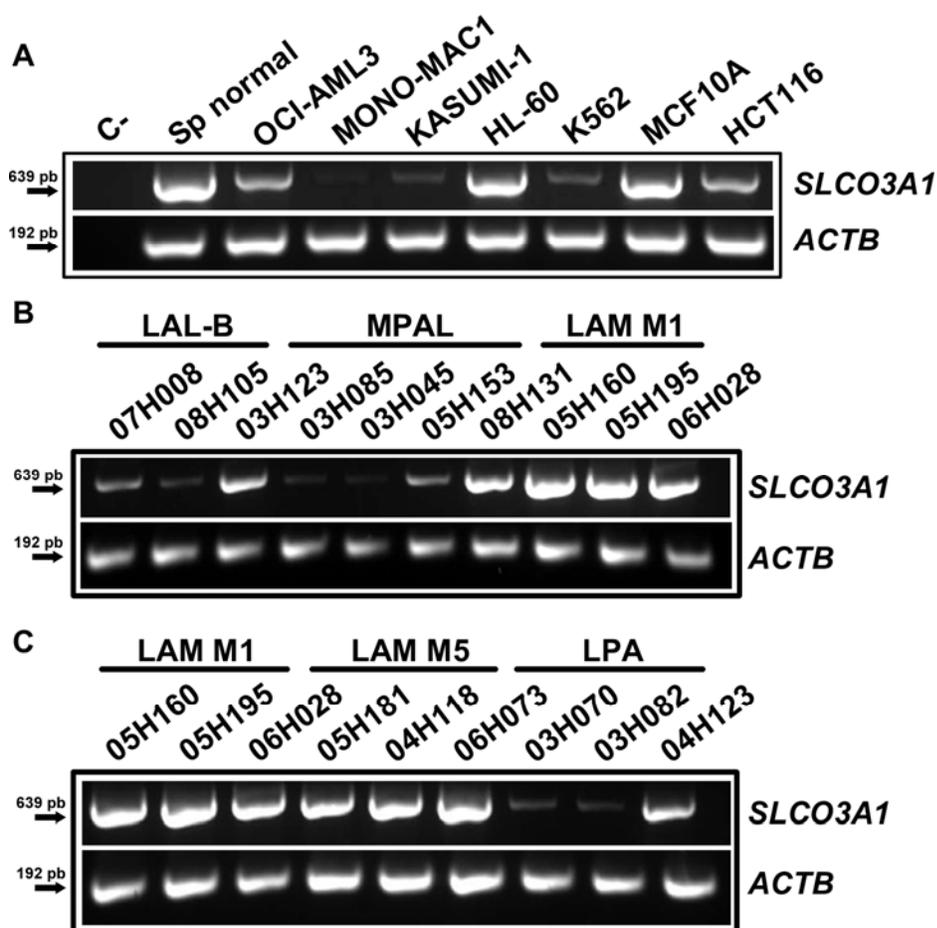


Figure 6.9. Expression du gène *SLCO3A1* dans les cellules de leucémies primaires, de sang normal et de lignées de cancers. (A) Une expression hétérogène de *SLCO3A1* (639 pb) est détectée dans les différentes lignées de cancers et dans le spécimen de sang normal (Sp normal). La bêta-actine (*ACTB*, 192 pb) a servi de contrôle de charge pour chaque échantillon. (B) Une expression hétérogène de *SLCO3A1* est notée dans les cellules primaires de différents spécimens de leucémie aiguë lymphoblastique B (LAL-B), de leucémie aiguë à phénotype mixte (MPAL) et de leucémie aiguë myéloïde (LAM). (C) Une expression hétérogène de *SLCO3A1* est notée dans les cellules primaires de différents spécimens de LAM sans maturation (M1), de leucémie myéloblastique/monocytaire aiguë (M5) et de leucémie promyélocytaire aiguë (LPA).

Une étude de qRT-PCR a confirmé une très faible expression de *SLCO3A1* dans les cellules des patients étudiés avec MPAL, étant de 3,6 à 25 fois moins exprimé par rapport aux moelles normales (Table 6.3). Cette étude démontre aussi que *SLCO3A1* s'exprime davantage dans le spécimen présentant la t(15;21)(q26.1;q22) par rapport aux trois autres cas de MPAL, mais demeure très faible sur le plan quantitatif ($RQ_{08H131} = 0,28$ versus $RQ_{MPAL} = 0,04$ à $0,08$). En effet, une réduction de 3,6 fois a été observée dans les cellules du spécimen 08H131 par rapport à l'échantillon calibrateur, supportant la présence d'une délétion d'un allèle. Par ailleurs, aucune amplification de l'ARNm de *SLCO3A1* n'a été détectée dans les cellules de la lignée de LAL-B (REH).

BCLQ	<i>RUNX1</i> ex1a-1b		<i>RUNX1</i> ex1b-2		<i>RUNX1</i> ex4-5		<i>SLCO3A1</i>	
	<i>HPRT</i>	<i>TBP</i>	<i>HPRT</i>	<i>TBP</i>	<i>HPRT</i>	<i>TBP</i>	<i>HPRT</i>	<i>TBP</i>
MN	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
03H045	3,29	2,19	2,34	1,56	2,32	1,58	0,06	0,04
03H085	1,84	1,78	1,41	1,36	0,88	0,87	0,06	0,06
05H153	1,64	1,55	1,30	1,23	1,13	1,09	0,08	0,08
08H131	5,06	3,78	1,44	1,08	0,65	0,49	0,38	0,28
REH	2,13	2,11	0,87	0,86	1,56	1,58	0,00	0,00

Table 6.3. Valeurs de quantification relative spécifique à chaque essai et à chacun des patients étudiés. Les valeurs par rapport à chacun des deux gènes contrôles *HPRT* et *TBP* sont notées pour les 4 cas de leucémie aiguë à phénotype mixte étudiés et pour la lignée REH. La moyenne de trois moelles osseuses de donneurs sains (MN) a servi de calibrateur.

6.6 SV2B, une glycoprotéine des vésicules synaptiques

SV2B est un gène de 14 exons localisé à la bande chromosomique 15q26.1 qui code pour une glycoprotéine à 12 passages transmembranaires exprimée dans les vésicules synaptiques au sein des terminaisons synaptiques des neurones. SV2B est un transporteur membranaire qui semble pouvoir réguler les niveaux de calcium pré-synaptique précédant le relâchement et l'exocytose des neurotransmetteurs dans la synapse (Wan et al., 2010). L'expression de *SV2B*, initialement décrite dans le système nerveux central (Bajjalieh et al., 1993), a ensuite été détectée dans une variété de tissus incluant les reins, les poumons, l'appareil digestif (estomac, petit intestin, colon), les organes génitaux (utérus, ovaires et testicules), la peau et le placenta (Miyachi et al., 2006). Deux transcrits de *SV2B*, exprimant 12 ou 14 exons, codent respectivement pour des protéines de 532 acides aminés (codon d'initiation dans l'exon 2) et de 683 acides aminés (codon d'initiation dans l'exon 1b). Outre des mutations de *SV2B* observées dans certains cancers répertoriés dans la banque de données COSMIC de Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) (carcinome de l'ovaire et gliome), aucune autre association avec le cancer n'a été rapportée pour ce gène. Nous décrivons donc, pour la première fois, l'implication du gène *SV2B* dans la leucémie comme nouveau partenaire de fusion de *RUNX1*. Le rôle joué par cette protéine dans la leucémogénèse n'est toutefois pas élucidé.

6.7 Étude d'expression de *RUNX1* dans les tissus hématopoïétiques normaux et leucémiques

Cette translocation a la particularité de posséder un point de cassure localisé dans l'intron 1b de *RUNX1*. À l'exception de la t(12;21)(p13;q22)/fusion *ETV6-RUNX1*, la t(15;21)(q26.1;q22) est, à notre connaissance, la seule autre translocation où *RUNX1* est réarrangé au sein de cette région. D'après nos analyses, le promoteur P1 distal de *RUNX1* est dissocié du reste des exons codants pour le transcrit *RUNX1c*, altérant possiblement l'expression de cette longue forme. Ainsi, les profils d'expression des différents transcrits de *RUNX1* (*RUNX1a/b* et *RUNX1c*) ont été étudiés en qRT-PCR à l'aide d'essais ciblant les jonctions des exons 1a et 1b (IR3041, 5'AGCCTGGCAGTGTGTCAGAAGT ; 5'GGGACTCAATGATTTCTTTTACCA avec la sonde UPL#40), des exons 1b et 2 (IR3252, 5'CCTTCAGAAGAGGGTGCATT ; 5'TGGACGTCTCTAGAAGGATTCAT avec la sonde UPL#69) et des exons 4 et 5 de *RUNX1* (IR3042, 5'TCGGCTGAGCTGAGAAATG ; 5'GTGATGGTCAGAGTGAAGCTTTT avec la sonde UPL#46) (Fig. 6.10). Ces essais ont été utilisés afin de confirmer une possible diminution d'expression du transcrit *RUNX1c* dans les cellules du spécimen présentant la t(15;21)(q26.1;q22). Quatre spécimens de MPAL avec t(9;22)(q34;q11.2) incluant le spécimen 08H131, la lignée REH avec t(12;21)(p13;q22)/*ETV6-RUNX1* exprimant aussi un point de cassure dans l'intron 1b de *RUNX1* ainsi que trois spécimens de moelle osseuse de donneurs sains (07H088, 07H140, 09H007) ont été utilisés (Annexe, table 9.9). La moyenne des trois

spécimens de moelle normale et les gènes *HPRT* et *TBP* ont servi de calibrateur et de contrôles endogènes respectivement (Table 2.7). Puisque la déviation standard des valeurs de delta Ct était moindre avec le contrôle *TBP*, celui-ci a été retenu pour l'analyse finale.

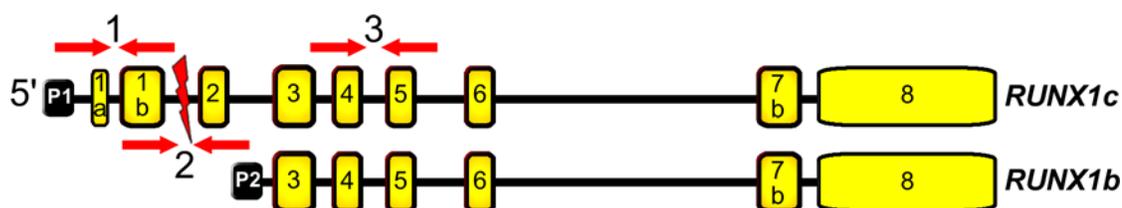


Figure 6.10. Positionnement des trois essais de PCR quantitative en temps réel. Le couple d'amorces no.1 permet l'amplification des exons 1a et 1b lesquels sont uniques à *RUNX1c*. Le couple d'amorces no.2 permet l'amplification des exons 1b et 2, également unique à *RUNX1c*, et se situe de part et d'autre du point de cassure des t(15;21)(q26.1;q22) et t(12;21)(p13;q22) (représenté par un éclair rouge). Le couple d'amorces no.3 permet l'amplification des exons 4 et 5 lesquels sont exprimés par les transcrits *RUNX1b* (et *RUNX1a*) ainsi que *RUNX1c*.

Cette étude nous a d'abord permis d'évaluer sur le plan quantitatif l'expression de certains exons (1a-1b, 1b-2 et 4-5) exprimés par les transcrits *RUNX1a*, *RUNX1b* et/ou *RUNX1c* de la moelle osseuse normale par l'observation des valeurs de Ct obtenues pour chaque essai pour un même spécimen. Pour chacun des échantillons de moelle normale, une amplification plus rapide des exons 4-5 a été observée par rapport aux exons 1a-1b et 1b-2 (Fig. 6.11B). En effet, puisque ces exons sont exprimés conjointement par tous les transcrits étudiés, ils sont ainsi plus nombreux sur le plan quantitatif et détectés plus

rapidement. Cette expression plus élevée des exons 4-5 a aussi été observée pour les trois spécimens indépendants de MPAL sans t(15;21)(q26;q22) (Fig. 6.11B). Toutefois, dans les cellules du spécimen avec t(15;21)(q26;q22), ce sont plutôt les exons 1a-1b qui ont d'abord été amplifiés, suggérant à première vue un dosage inadéquat des différents transcrits de *RUNXI* dans ces cellules (Fig. 6.11A).

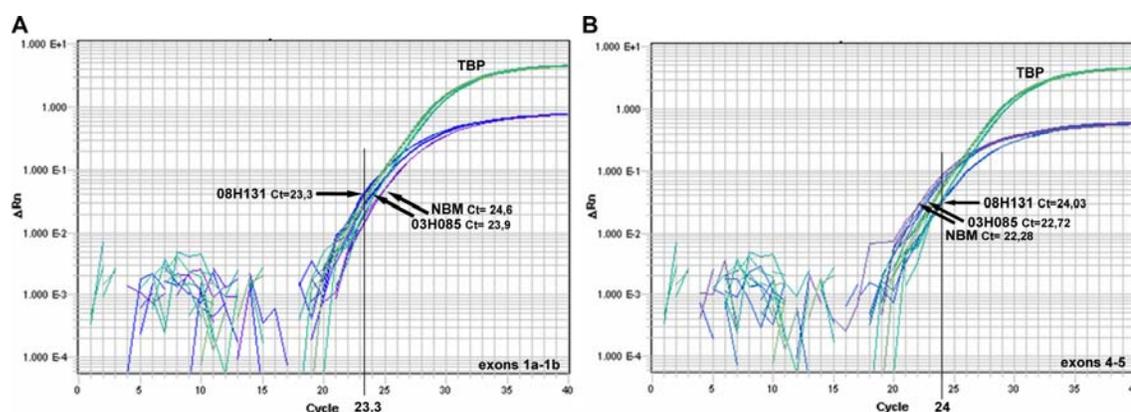


Figure 6.11. Valeurs de « cycle threshold » (Ct) brutes obtenues pour les spécimens de leucémies aiguës à phénotype mixte (MPAL) et de moelles normales étudiés. (A) Courbes représentatives obtenues pour l'essai Taqman ciblant les exons 1a et 1b de *RUNXI* (IR3041) pour un spécimen de moelle normale (NBM), un spécimen de MPAL sans t(15;21)(q26.1;q22) (03H085) et le spécimen de MPAL avec t(15;21)(q26.1;q22) (08H131). Les courbes d'amplification du contrôle endogène *TBP* sont représentées pour chacun des spécimens (courbes en vert). (B) Courbes représentatives obtenues pour l'essai Taqman ciblant les exons 4 et 5 de *RUNXI* pour les spécimens NBM, 03H085 et 08H131. Les courbes d'amplification du contrôle endogène *TBP* sont représentées (courbes en vert).

Puisque l'expression majoritaire des exons 4 et 5 s'observe à la fois dans les spécimens de MPAL et dans les moelles normales, cette différence d'expression est perdue suite aux étapes de normalisation des Ct par rapport au contrôle endogène et au calibrateur (méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$). Globalement, on remarque plutôt une légère hausse d'expression associée aux exons 1a-1b de *RUNXI* dans chacun des spécimens primaires étudiés par rapport aux moelles normales. Pour les trois échantillons de MPAL sans $t(15;21)(q26.1;q22)$, une expression similaire variant légèrement a été observée entre les exons 1a-1b et 1b-2 de *RUNXI* (1,3 à 1,4 fois plus exprimé) traduisant possiblement l'expression de différents transcrits résultant de l'épissage alternatif dans ces spécimens. De façon intéressante, une différence d'expression de 2,5 fois et 3,5 fois supérieure a respectivement été observée pour les exons 1a-1b dans les deux échantillons ayant un point de cassure dans l'intron 1b de *RUNXI* (spécimen 08H131 et lignée REH) par rapport aux exons 1b-2. En effet, ces exons 1b-2 sont complètement dissociés et ne sont plus conjointement exprimés au niveau de l'allèle réarrangé dans ces spécimens, ce qui se traduit par une expression deux fois moindre de ces exons. Une importante différence d'expression des exons 1a-1b a aussi été observée dans les cellules du spécimen 08H131, étant 7,8 fois plus exprimés comparativement aux exons 4-5. Ces exons 4 et 5 codant pour le RHD sont aussi deux fois moins exprimés par rapport aux moelles normales dans ce spécimen et s'expriment plus faiblement comparativement aux autres spécimens de MPAL. Ces résultats suggèrent un dosage inadéquat des exons 4 et 5 et une expression anormale des différents transcrits de *RUNXI* dans les cellules de cette patiente présentant la $t(15;21)(q26.1;q22)$. Une hyperméthylation du promoteur P2 de

RUNXI ou une délétion des exons 4 et 5 sont deux causes pouvant expliquer cette réduction d'expression. En effet, lors des analyses par FISH à l'aide de la sonde RP11-299D9 couvrant les exons 2 à 8 du gène, le signal localisé sur le der(21) était plus petit que le signal normal suggérant une délétion possible (Fig. 6.2D).

En résumé, ces résultats démontrent une réduction de l'expression du transcrit *RUNXIc* dans les cellules présentant une t(15;21)(q26.1;q22) et suggèrent l'existence d'un possible débalancement génomique relié à une délétion des exons plus télomériques de *RUNXI* localisés sur le der(21). Ces analyses nous permettent de proposer qu'un dosage aberrant des transcrits de *RUNXI* puisse être impliqué dans la pathogenèse de cette leucémie.

6.8 Mécanismes de leucémogénèse proposés pour la fusion *RUNXI-SV2B*

Cette nouvelle translocation t(15;21)(q26.1;q22) présente au moins trois particularités. D'abord, elle exprime une cassure localisée au sein de l'intron 1b de *RUNXI* menant à l'altération possible de l'expression du transcrit *RUNXIc*. Cette cassure a ensuite été réparée avec les séquences du gène *SV2B*, ce qui permet l'expression de transcrits anormaux entre l'exon 1b de *RUNXI* et l'intron 1 de *SV2B* (brin anti-sens). Enfin, une large délétion ciblant le gène *SLCO3A1* et possiblement ses séquences adjacentes a aussi été observée.

Une cassure dans l'intron 1b de *RUNXI* est une caractéristique qui était, à ce jour, unique à la t(12;21)(p13;q22). L'existence d'une telle cassure signe une altération de l'expression du transcrit *RUNXIc* par dissociation du promoteur P1 des exons qu'il régule (c'est-à-dire des exons 1b à 8). Tel que démontré par qRT-PCR, l'expression du transcrit *RUNXIc* est grandement réduite dans les cellules présentant la t(15;21)(q26.1;q22) pouvant mener à une réduction de l'expression de l'isoforme protéique de 480 acides aminés. *RUNXI* est un gène dont l'expression et le dosage sont fortement contrôlés. Un dosage inadéquat de *RUNXI*, soit par augmentation (amplification) ou par réduction (délétion ou mutation), représente une condition menant au développement hématopoïétique anormal, tel que décrit dans les LAL, dans le désordre FPD et dans les LAM. Malgré que des études protéiques n'ont pas été réalisées sur ce spécimen, nos analyses nous permettent de postuler qu'une réduction de l'isoforme *RUNXIc* est rencontrée dans les cellules présentant cette t(15;21)(q26.1;q22). De plus, nos données d'expression appuyées par les analyses de FISH suggèrent également une réduction possible de l'expression des exons 4 à 5 de *RUNXI* indiquant que les transcrits *RUNXIb* et *RUNXIa* exprimés à partir du promoteur P2 de l'allèle réarrangé puissent aussi être affectés. Ceci dit, des formes protéiques tronquées de *RUNXI* pourraient hypothétiquement être traduites et être exprimées à partir de sites alternatifs de la traduction de *RUNXI* dans ces cellules. Tel que discuté dans l'introduction, la fonction des différentes isoformes protéiques de *RUNXI* est très peu étudiée. L'expression des transcrits de *RUNXI* (*RUNXIb* versus *RUNXIc*) a été analysée

par qRT-PCR dans les cellules de la moelle osseuse humaine totale et dans les CSH/progénéiteurs CD34⁺/CD38⁻ purifiés (Tsuzuki et al., 2007; Challen and Goodell 2010). L'analyse de la moelle osseuse totale adulte a démontré que l'expression de *RUNXI* était majoritairement due à la forme *RUNXIb* (< 80 %). Selon Challen et collaborateurs, *RUNXIc* est une forme plus rare exprimée dans la moelle totale qui semble hautement spécifique aux CSH/progénéiteurs (CD34⁺/CD38⁻) puisque plus de 80 % de l'expression totale de *RUNXI* dans ces cellules est due à ce transcrite (Challen and Goodell 2010). Par ailleurs, l'équipe de Tsuzuki et collaborateurs qui a aussi étudié la distribution des transcrits de *RUNXI* (*RUNXIb/c* versus *RUNXIa*) a plutôt utilisé des cellules dérivées de sang de cordon humain ainsi qu'une technique de RT-PCR avec des amorces localisées dans l'exon 5 et 7a (*RUNXIa*) ou 7b (*RUNXIb/c*). Malgré une expression prédominante des transcrits *RUNXIb/c* rapportée dans tous les compartiments cellulaires analysés par ces auteurs (CD34⁺/progénéiteurs, CD15⁺/cellules myélomonocytaires et CD36⁺/cellules érythroïdes), ils suggèrent que la forme *RUNXIa* serait seulement observée dans le compartiment CD34⁺, mais toujours en nombre inférieur par rapport aux formes *RUNXIb/c* (ratio 1:6) (Tsuzuki et al., 2007). Puisque la forme *RUNXIc* seule n'a pas été étudiée par Tsuzuki et collaborateurs, il nous est difficile de conclure avec certitude que la forme *RUNXIc* représente le transcrite le plus exprimé dans la population de CSH/progénéiteurs adultes CD34⁺/CD38⁻.

Challen et collaborateurs ont aussi démontré que la surexpression rétrovirale de *RUNXIb* ou de *RUNXIc* dans les cellules CD34⁺/CD38⁻ isolées de moelle osseuse

adulte induit la quiescence de ces cellules via l'activation possible de la voie NOTCH et de sa cible *Hes1* (Challen and Goodell 2010). *RUNX1c* semble donc contrôler, de façon négative, la prolifération des CSH/progénéiteurs lors de l'hématopoïèse adulte. Tel que vu dans la section 4.6, une expression lentivirale de *RUNX1a* dans des cellules de sang de cordon humain favorise plutôt la prolifération des cellules hématopoïétiques CD34⁺/CD38⁻ (Tsuzuki et al., 2007). Selon ces données, un rôle opposé des formes *RUNX1c* et *RUNX1a* dans la régulation de la prolifération/expansion des progénéiteurs CD34⁺ adultes peut être proposé. Puisque l'expression de *RUNX1c* est réduite dans les cellules du cas 08H131 avec t(15;21)(q26.1;q22), nous pouvons émettre l'hypothèse que cette réduction d'expression pourrait entraîner une perte d'un des contrôles négatifs agissant sur la prolifération des CSH/progénéiteurs et pourrait favoriser la prolifération de la population de cellules plus immatures à l'origine de cette MPAL. Dans le cas 08H131, une t(9;22)(q34;q11.2) s'exprime possiblement comme anomalie génétique primaire. La CSL exprimant la t(9;22)(q34;q11.2) est décrite comme une CSH quiescente relativement résistante à des thérapies capables d'éradiquer les cellules en division rapide. Il est donc possible que la réduction d'expression de *RUNX1c* dans ces cellules, suite à l'acquisition de la t(15;21)(q26.1;q22), puisse conférer un avantage prolifératif aux CSL co-exprimant les t(9;22)(q34;q11.2) et t(15;21)(q26.1;q22).

La délétion ciblant le gène *SLCO3A1* détectée dans les cellules de MPAL avec t(15;21)(q26.1;q22) pourrait aussi avoir un rôle dans la pathogenèse de cette leucémie, quoique la possibilité d'un variant normal n'ait pas été exclu. Afin d'éclaircir ceci, une

étude d'un plus grand nombre de cas de ce type de leucémie, en utilisant la technique de « SNParray » avec une étude de l'ADN normal pairé à chaque cas, serait nécessaire. De façon intéressante, *SLCO3A1* est un transporteur à anion organique capable de permettre le passage de larges composés organiques et de composés toxiques vers l'intérieur de la cellule. Une corrélation peut être établie avec le transporteur *hOCT1* (aussi *SLC22A1*) lequel code pour un transporteur organique de cation de la famille des OATP qui permet le transport actif de l'Imatinib (Gleevec/STI-571) vers l'intérieur de la cellule (Schiffer et al., 2003; Thomas et al., 2004). *hOCT1* a été démontré comme un facteur important de la réponse à l'Imatinib chez les patients en phase chronique de la LMC (Engler et al., 2011). Des publications supportent que certains membres de la famille OATP/SLCO dont notamment *SLCO1B3*, un autre transporteur d'anion organique, puissent aussi permettre le passage de larges cations organiques incluant certaines drogues dont l'Imatinib (Nambu et al., 2011).

Enfin, la $t(15;21)(q26.1;q22)$ permet l'expression d'une portion de l'ADN du brin anti-sens de l'intron 1 de *SV2B*. Ce phénomène n'a été rapporté, à notre connaissance, qu'une seule fois lors d'une fusion impliquant *ETV6* chez un patient ayant une LMMC transformée en LAM. Normalement, le brin d'ADN anti-sens ne permet pas la traduction de protéines, mais sert plutôt de matrice pour la création d'ARNm. Le brin anti-sens sert à la conservation de la séquence d'ADN puisqu'il possède des bases complémentaires au brin codant. Il est donc identique à l'ARNm qui sera engendré par le brin sens codant. Or, afin qu'il ne soit pas transcrit, le sens de la transcription est

inversé (3'→5'). Le point de cassure dans l'intron 1 de *SV2B* altère possiblement la traduction de la protéine exprimée à partir du transcrit 1 puisque le cadre de lecture débute dans l'exon 1b de *SV2B*, mais permet cependant une expression normale du variant 2. Malgré qu'aucune fonction connue ne nous permette d'établir de lien entre un réarrangement de *SV2B* et la leucémie, la structure complexe et atypique de cette translocation suggère qu'un ou les deux acteurs de cette translocation puissent contribuer au processus de leucémogénèse.

7. Profil d'expression des cibles des fusions *RUNX1*

7.1 Études d'expression des gènes *CEBPA* et *CRT* dans les leucémies primaires et lignées de cancers hématologiques

Suite à la caractérisation moléculaire des translocations $t(7;21)(p22;q22)$, $t(1;21)(p22;q22)$, $t(8;21)(q23.3;q22)$ et $t(15;21)(q26.1;q22)$, nous nous sommes intéressées à évaluer si ces différentes fusions *RUNX1* partageaient des cibles communes de dérégulation transcriptionnelle. Nous avons ainsi débuté une étude d'expression d'une variété de cibles déjà connues de la fusion *RUNX1-RUNX1T1*, dont l'expression est modifiée dans les cellules leucémiques primaires présentant cette anomalie. Il est accepté que la fusion *RUNX1-RUNX1T1* puisse déréguler les niveaux d'expression de plusieurs cibles dépendantes de RUNX1 sauvage telles que *CDKN1A*, *CSF1R*, *PI4ARF* de même que l'expression de certaines autres cibles n'exprimant pas de séquence consensus de RUNX1, c'est-à-dire indépendantes de la régulation par ce facteur de transcription (exemple : *CEBPA*). Parmi une vaste gamme de cibles, nous avons sélectionné certains gènes régulateurs spécifiquement impliqués dans la différenciation hématopoïétique (*CEBPA*, *SPI1* et *CRT/calréticuline*) ainsi que certaines composantes de la voie Wnt impliquées dans l'auto-renouvellement des CSH (*JUP/γ-catenine/CTNNG1*, *CTNNB1/β-catenine*, *CCND1/cycline D1* et *MYC*).

CEBPA est un facteur de transcription de type « engagé et lignée spécifique » impliqué dans la différenciation de la lignée myéloïde et plus spécifiquement dans la différenciation de la lignée granulocytaire (neutrophiles) (Koschmieder et al., 2009; Reckzeh and Cammenga 2010). CEBPA s'exprime faiblement dans les CSH et son expression augmente progressivement dans les CMP puis dans les GMP afin de permettre le développement des granulocytes matures (Koschmieder et al., 2009). CEBPA s'exprime en une longue et une courte forme de 42 kDa et de 30 kDa respectivement. Seule la longue forme est capable d'interagir avec l'appareil transcriptionnel (TBP/TF-IIB et p300/CBP) grâce à son domaine de transactivation (TAD1) localisé en position N-terminale tandis que les deux isoformes, exprimant les domaines TAD2 et bZIP « basic leucine zipper » localisés en position C-terminale, permettent la liaison à l'ADN et les interactions avec les autres facteurs de transcription et les complexes de remodelage de la chromatine (SWI/SNF) (Reckzeh and Cammenga 2010). L'expression de CEBPA est contrôlée par une variété de protéines incluant hnRNP E2, PDI « protein disulfide isomerase » et la protéine CRT. La protéine CRT est multi-fonctionnelle et ses fonctions ne sont que partiellement comprises (protéine chaperone, liaison aux ions calcium, régulation de l'expression génique, etc.) (Mendlovic and Conconi 2011). Chacune de ces protéines a pour fonction de bloquer la traduction de CEBPA suite à une liaison à l'ARNm du gène (Perrotti et al., 2002; Timchenko et al., 2002; Haefliger et al., 2011). CEBPA est capable d'auto-régulation par la liaison de son domaine bZIP à son propre promoteur et demeure, jusqu'à maintenant, le seul facteur capable d'activer l'expression du gène (Timchenko et al.,

1995). Malgré une interaction décrite entre le domaine RHD et le domaine bZIP de CEBPA, RUNX1 n'a pas encore été impliqué dans l'activation de *CEBPA* sur le plan transcriptionnel, représentant donc à présent, une cible indirecte de cet important régulateur.

Dans les cancers hématologiques, un arrêt de maturation de la lignée myéloïde est souvent observé, pouvant être partiellement expliqué par une dérégulation de *CEBPA*. Notamment, l'ARNm de *CEBPA* et la protéine sont diminués dans la lignée Kasumi-1 et dans les leucémies primaires avec anomalies du CBF incluant la t(8;21)(q22;q22) et l'inv(16)(p13q22) (Pabst et al., 2001; Cilloni et al., 2003; Pabst and Mueller 2007; D'Alo et al., 2008; Hackanson et al., 2008). L'ARNm de *CEBPA* n'est cependant pas réduit dans les cellules présentant une t(3;21)(q26;q22), mais une réduction de la protéine est observée suite à une augmentation de l'activité de CRT dans ces cellules (Helbling et al., 2004). L'expression de l'ARNm de *CRT* n'a été évaluée que dans les LAM M4 avec ou sans inv(16)(p13q22), révélant une augmentation de l'ARNm de 8,2 fois et des niveaux plus élevés de la protéine chez les patients avec inv(16)(p13q22) (Helbling et al., 2005). La protéine CEBPA est également réduite dans la LMC-PB suite à l'expression augmentée de hnRNP E2 (Perrotti et al., 2002), démontrant les différentes méthodes employées par une cellule afin d'altérer les processus essentiels de l'hématopoïèse normale et de la différenciation granulocytaire.

Deux études de qRT-PCR ont été entreprises afin d'étudier l'expression des gènes *CEBPA*, *CRT*, *JUP* et *MYC* dans différents groupes de leucémies (Table 2.7). Lors d'une première étude, l'ADNc a été synthétisé à partir de l'ensemble « SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR » de Invitrogen et d'amorces « random primers ». Trois moelles normales (un patient avec moelle morphologiquement normale et deux moelles de donneurs sains), vingt spécimens de leucémies avec des réarrangements récurrents du CBF [$t(8;21)(q22;q22)$, $n = 10$; $inv(16)(p13q22)$, $n = 10$], treize spécimens avec un caryotype normal (NK), deux lignées leucémiques avec un réarrangement de *RUNX1* (REH et Kasumi-1) et cinq spécimens avec une translocation plus rare de *RUNX1* regroupant les quatre cas précédemment décrits avec $t(7;21)(p22;q22)/RUNX1-USP42$, $t(1;21)(p22;q22)/RUNX1-CLCA2$, $t(8;21)(q23.3;q22)/RUNX1-TRPS1$ et $t(15;21)(q26.1;q22)/RUNX1-SV2B$ ainsi qu'un cas de LMC-PB présentant une $t(1;21)(p36;q22)$ et exprimant une fusion *RUNX1-PRDM16* (Hazourli et al., 2006) ont été analysés lors de cette étude préliminaire (Table 2,7 et annexe, table 9.6). La fusion *RUNX1-PRDM16*, étudiée dans notre laboratoire, permet la création de chimères de fusion ainsi que l'émergence d'isoformes tronquées de *RUNX1* suite à la traduction des huit transcrits de fusion « in-frame » et « out-of-frame » identifiés dans les cellules leucémiques de ce cas (Hazourli et al., 2006).

Les résultats de cette première étude ont été confirmés dans une seconde expérience indépendante utilisant les mêmes amorces/sondes de qRT-PCR et les mêmes contrôles endogènes, mais un système de synthèse d'ADNc ainsi que des calibrateurs différents

(moelles normales dérivées de donneurs sains uniquement) (Table 2.7 ; annexe, table 9.7). Dans l'étude de validation, trois moelles normales, dix-sept spécimens de leucémies avec des réarrangements récurrents du CBF [t(8;21)(q22;q22), $n = 10$; inv(16)(p13q22), $n = 7$], quinze leucémies avec caryotype normal (NK), quatre leucémies M2 avec un caryotype anormal sans t(8;21)(q22;q22), les lignées leucémiques REH et Kasumi-1 ainsi que cinq spécimens avec une translocation plus rare de *RUNX1* [t(7;21)(p22;q22)/*RUNX1-USP42*, t(1;21)(p22;q22)/*RUNX1-CLCA2*, t(8;21)(q23.3;q22)/*RUNX1-TRPS1*, t(15;21)(q26.1;q22)/*RUNX1-SV2B*, t(1;21)(p36;q22)/*RUNX1-PRDM16*] ont été étudiés (Annexe, table 9.7). Les niveaux d'expression de *CEBPA*, *CRT*, *JUP*, *MYC* ainsi que de deux autres cibles (*CCND1* et *CTNNB1*) ont été analysés dans ces 46 spécimens. L'ADNc de ces spécimens a été synthétisé à partir de l'ensemble « High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » de ABI et d'amorces « random primers ». Pour chacune des deux études (préliminaire et validation), la moyenne des trois moelles normales et le gène *HPRT* ont respectivement servi de calibrateur et de contrôle endogène (Table 2.7). Les statistiques ont été effectuées sur les données de l'étude de validation, à l'aide du test non paramétrique Mann-Whitney. L'expression des gènes *CEBPA* et *CRT* sera d'abord présentée.

	<i>RUNX1</i> $n=5$	t(8;21) $n=10$	Inv(16) $n=7$	NK $n=15$
<i>CEBPA</i>	0,34	0,48	0,53	1,04
<i>CRT</i>	0,38	1,70	1,61	0,70
<i>JUP</i>	5,21	23,87	11,23	1,71
<i>MYC</i>	1,13	2,98	2,21	0,94

Table 7.1. Valeurs moyennes de quantification relative obtenues pour les gènes *CEBPA*, *CRT*, *JUP* et *MYC* étudiés dans chacun des quatre principaux groupes de leucémies de l'étude préliminaire. *RUNX1*, patients ayant une anomalie plus rare de *RUNX1*, excluant les t(8;21)(q22;q22) et t(3;21)(q26;q22); t(8;21), patients avec t(8;21)(q22;q22); inv(16), patients avec inv(16)(p13q22); NK, patients avec un caryotype normal.

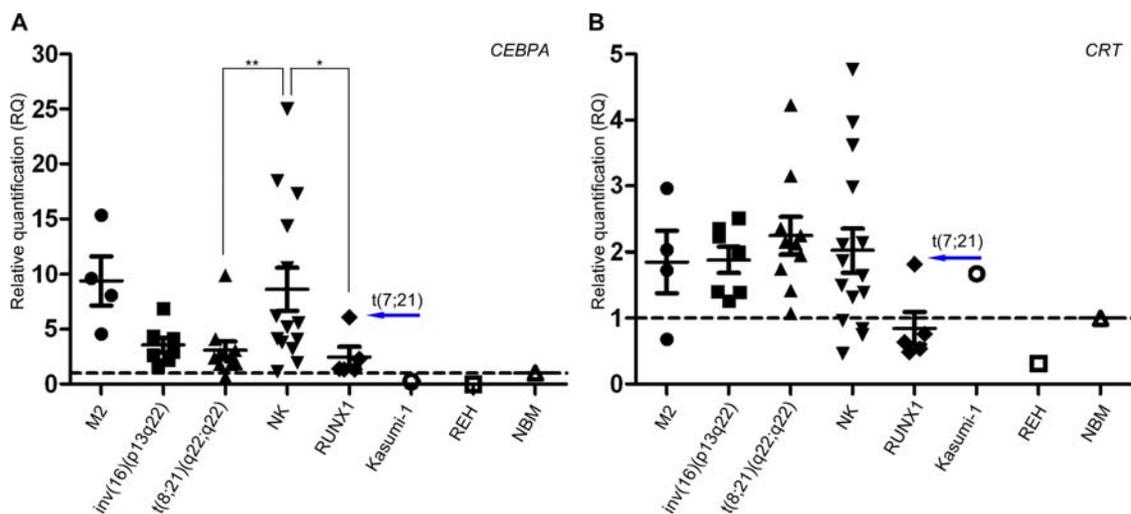


Figure 7.1. Valeurs de quantification relative obtenues pour les gènes *CEBPA* et *CRT* dans les cellules primaires de patients leucémiques, de lignées leucémiques et de moelles normales. (A) L'expression de l'ARNm de *CEBPA* a été analysée dans 41 spécimens de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) primaires (LAM avec maturation ayant un caryotype anormal sans t(8;21)(q22;q22)(M2), $n = 4$; avec inv(16)(p13q22), $n = 7$; avec t(8;21)(q22;q22), $n = 10$; avec caryotype normal (NK), $n = 15$; avec anomalie plus rare de *RUNX1*, $n = 5$), deux lignées leucémiques avec fusions *RUNX1* (Kasumi-1, REH) ainsi que dans trois moelles normales (NBM, calibrateur). Une différence significative d'expression a été observée, selon le test Mann-Whitney, entre les groupes de LAM avec t(8;21)(q22;q22) et NK (, $p = 0,0092$) et de LAM avec anomalie plus rare de *RUNX1* et NK (*, $p = 0,0465$). L'expression de *CEBPA* est plus élevée dans les cellules du patient avec t(7;21)(p22;q22) ($RQ_{t(7;21)} = 6,08$ versus**

$RQ_{RUNXI} = 2,49$) que dans les autres cas avec fusions plus rares de *RUNXI*. Les données de l'étude de validation sont présentées. (B) L'expression de l'ARNm de *CRT* a été analysée dans cette même cohorte de 41 patients. Aucun groupe de leucémies ne présentait de dérégulation supérieure à 5. Une expression moyenne environ deux fois supérieure par rapport au calibrateur a été observée pour les groupes M2, inv(16)(p13q22), t(8;21)(q22;q22) et NK. Une valeur de RQ à 1,8 a été observée dans les cellules du patient avec t(7;21)(p22;q22), cette valeur étant supérieure à la moyenne du groupe *RUNXI* ($RQ = 0,85$). Les données de l'étude de validation sont présentées. La moyenne et le SEM « standard error of the mean » (barres d'erreur) sont indiqués pour chaque groupe de patients. Le gène *HPRT* et la moyenne de trois moelles normales ont respectivement servi de contrôle endogène et de calibrateur (ligne horizontale pointillée) dans cette étude.

Dans ces études, nous avons détecté puis confirmé une diminution significative des niveaux d'ARNm de *CEBPA* dans le groupe de leucémies avec t(8;21)(q22;q22) par rapport au groupe de leucémies NK ($RQ_{t(8;21)} = 3,08$ versus $RQ_{NK} = 8,64$; **, $p = 0,0092$) (Fig. 7.1A et table 7.2). Une réduction des niveaux d'ARNm de *CEBPA* a aussi été détectée dans le groupe génétique avec inv(16)(p13q22) par rapport au groupe NK, mais cette différence n'est pas statistiquement significative ($RQ_{inv(16)} = 3,57$ versus $RQ_{NK} = 8,64$, $p = 0,12$) (Fig. 7.1A et table 7.2). Une réduction significative d'expression de *CEBPA* a aussi été détectée entre les groupes de leucémies avec anomalies plus rares de *RUNXI* et avec NK ($RQ_{RUNXI} = 2,49$ versus $RQ_{NK} = 8,64$, $p = 0,0465$) et cette différence est d'autant plus significative lorsque tous les patients avec anomalies de la bande 21q22, incluant les t(8;21)(q22;q22) et les réarrangements plus rares de *RUNXI*, sont regroupés et comparés au groupe de LAM NK ($p = 0,0037$). Plus spécifiquement,

une importante réduction des niveaux d'ARNm de *CEBPA* a été observée pour les échantillons avec $t(1;21)(p22;q22)/RUNXI-CLCA2$, $t(8;21)(q23.3;q22)/RUNXI-TRPS1$, $t(15;21)(q26.1;q22)/RUNXI-SV2B$ et $t(1;21)(p36;q22)/RUNXI-PRDM16$ ($RQ_{t(1;21)/CLCA2} = 1,36$; $RQ_{t(8;21)} = 2,28$; $RQ_{t(15;21)/SV2B} = 1,34$ et $RQ_{t(1;21)/PRDM16} = 1,39$ versus $RQ_{NK} = 8,64$) et ce, dans les deux études. Parmi les échantillons étudiés avec anomalies plus rares de *RUNXI*, seul le spécimen avec $t(7;21)(p22;q22)$ ne présentait pas de réduction significative des niveaux d'ARNm de *CEBPA* par rapport au groupe de leucémies NK ($RQ_{t(7;21)} = 6,08$ versus $RQ_{NK} = 8,64$) (Fig. 7.1A). Ce résultat demeure toutefois à confirmer dans un plus grand nombre de cas avec fusion *RUNXI-USP42*.

La dérégulation de *CEBPA* (modèle murin « knock-out » *CEBPA*^{-/-} ou mutation) mène à un arrêt de la maturation granulocytaire et à l'accumulation de cellules myéloïdes immatures dans la moelle des souris présentant ces anomalies (Pabst and Mueller 2007; Reckzeh and Cammenga 2010). L'altération de *CEBPA* sur le plan transcriptionnel et traductionnel a principalement été étudiée par l'équipe du Dr Thomas Pabst qui a rapporté que la réduction de la protéine *CEBPA* concorde avec une augmentation de l'activité de *CRT* dans les LAM avec $t(3;21)(q26;q22)$ et avec une augmentation de l'ARNm et de la protéine *CRT* dans les LAM M4Eo avec $inv(16)(p13q22)$. Nos analyses de l'ARNm de *CRT* n'ont cependant pas démontré de surexpression significative de ce gène, c'est-à-dire supérieure à 5, dans aucun des groupes de leucémies étudiés et ce, dans les deux études. Or, une expression près de deux fois supérieure à la normale a été observée dans le groupe de LAM M4Eo avec

inv(16)(p13q22), concordant avec la littérature ($RQ_{inv(16)} = 1,88$), ainsi que dans le groupe de leucémies avec t(8;21)(q22;q22) ($RQ_{t(8;21)} = 2,25$), et ce, dans les deux études (Fig 7.1B) (Helbling et al., 2005). Dans les cellules de la lignée REH ainsi que dans les cellules leucémiques de quatre spécimens avec une anomalie plus rare de *RUNX1* [t(1;21)/*PRDM16*, t(1;21)/*CLCA2*, t(8;21)/*TRPS1* et t(15;21)/*SV2B*], une expression inférieure à la normale a été observée dans les deux études ($RQ_{REH} = 0,32$, $RQ_{t(1;21)/PRDM16} = 0,49$, $RQ_{t(1;21)/CLCA2} = 0,77$, $RQ_{t(8;21)} = 0,63$ et $RQ_{t(15;21)/SV2B} = 0,54$) (Fig. 7.1B). Or, une modeste augmentation de l'expression de *CRT* a été notée lors de l'étude de validation pour le groupe de leucémies NK, dans les cellules du patient avec t(7;21)(p22;q22) et dans la lignée Kasumi-1 ($RQ_{NK} = 2,02$; $RQ_{t(7;21)} = 1,82$; $RQ_{Kasumi-1} = 1,68$).

En résumé, une importante réduction de *CEBPA* ainsi qu'une augmentation de près de deux fois de l'ARNm de *CRT* ont été observées dans les LAM avec t(8;21)(q22;q22) et inv(16)(p13q22). De façon similaire à ces LAM, la majorité des leucémies avec anomalies plus rares de *RUNX1* présentent également une importante réduction de *CEBPA*, à l'exception du cas avec t(7;21)(p22;q22). Chez ces patients, la diminution de *CEBPA* ne corrèle pas avec une augmentation de *CRT*, suggérant l'existence d'autres mécanismes expliquant la réduction transcriptionnelle de *CEBPA* dans ces cellules. Tel que mentionné précédemment, les protéines CRT, hnRNP E2 ou PDI ne causent pas la dégradation de l'ARNm de *CEBPA*. En effet, il a été suggéré que la fusion RUNX1-RUNX1T1 puisse réduire l'expression de *CEBPA* par la suppression indirecte de l'auto-

régulation de ce facteur (Pabst et al., 2001). Or, lorsque la fusion RUNX1-RUNX1T1 ou RUNX1-EVI1 s'exprime, non seulement l'auto-régulation du gène *CEBPA* est abolie, mais la transcription semble aussi être réprimée par la fusion (Pabst et al., 2001; Tokita et al., 2007). Récemment, il a été rapporté, dans une étude utilisant des cellules NIH3T3, que RUNX1 puisse lier le promoteur murin de *Cebpa* et que ce dernier soit deux fois plus activé par RUNX1, suggérant, pour la première fois, une possible régulation de *Cebpa* par RUNX1. Des éléments en tandem respectant les séquences consensus de RUNX1 ont été identifiés sur le promoteur murin de *Cebpa* et ces sites sont aussi identifiés au sein du promoteur humain. Cependant, l'interaction directe entre RUNX1 et le promoteur humain de *CEBPA* est toujours en investigation (Guo and Friedman 2010). Une suppression de l'auto-régulation et un possible pouvoir de répression transcriptionnelle pourraient être conférés par les fusions RUNX1-PRDM16, RUNX1-TRPS1, RUNX1-CLCA2 et RUNX1-SV2B. L'absence d'une réduction significative de *CEBPA* dans les cellules avec fusion RUNX1-USP42 est cependant intrigante. Puisque l'allèle normal de *RUNX1* ainsi que les mutations du domaine RHD ont été étudiées dans ces cellules, une interaction entre la protéine CEBPA et la chimère RUNX1-USP42 est théoriquement possible, via le domaine bZIP et le RHD. Cependant, aucun domaine d'activation ni de répression transcriptionnelle n'a encore été identifié dans la protéine USP42, nous permettant de proposer que l'incapacité de cette fusion à recruter des co-répresseurs au promoteur de *CEBPA* puisse, du moins en partie, expliquer ce résultat. Puisque ni la transcription de *CEBPA* ni de *SPI1* (données présentées à la section 7.2) n'est réprimée par RUNX1-USP42, cette hypothèse est plausible.

7.2 Études d'expression des protéines SPI1, CEBPA et CRT dans les leucémies primaires et lignées de cancers hématologiques

Nos études d'expression de *CEBPA* et de *CRT* ont révélé une importante diminution des niveaux d'ARNm de *CEBPA* dans les cellules des patients avec anomalies plus rares de *RUNX1*, à l'exception du patient avec t(7;21)(p22;q22). En raison de l'absence de répression transcriptionnelle de *CEBPA* dans ces cellules, nous avons poursuivi notre travail avec une étude de l'expression de la protéine CEBPA, de la protéine CRT et du facteur de transcription SPI1 dans les cellules de ce spécimen afin d'évaluer une dérégulation potentielle sur le plan traductionnel. Des études en western blot ont été réalisées sur les protéines totales extraites des cellules mononuclées de huit lignées de cancers hématologiques (Table 2.8) et de quatre échantillons de leucémies primaires incluant le spécimen avec t(7;21)(p22;q22), un spécimen de LAM avec t(8;21)(q22.q22) ainsi que deux spécimens de LAM avec inv(16)(p13q22) (Table 2.9). Les anticorps contre les protéines SPI1 (Santa Cruz ; dilution : 1/1000, poids prédit : 31 kDa, poids observé : 40 kDa), CEBPA (Abcam ; dilution 1/10000, poids prédit et observé : 42 kDa et 30 kDa) et CRT (Sigma ; dilution 1/50000, poids prédit et observé : 55 kDa) ont été séquentiellement utilisés alors que l'alpha tubuline (Sigma ; dilution 1/5000, poids prédit

et observé : 50 kDa) a servi de contrôle de charge pour chaque échantillon étudié (Table 2.10).

Le facteur de transcription SPI1 est considéré comme un régulateur « engagé » lequel est, à la fois, impliqué dans la régulation des CSH et dans la différenciation des monocytes/macrophages et des lymphocytes B. Il s'exprime très tôt dans les CSH et son expression augmente afin de permettre la transition de la CSH vers les CLP (Tenen 2003; Huang et al., 2008). Lors de la lymphopoïèse B, une augmentation graduelle de *SPI1* est perçue de la CSH vers le lymphocyte B mature, toutefois son expression demeure globalement faible dans cette lignée afin de favoriser la différenciation B (Back et al., 2005; Ramirez et al., 2010). Une plus forte concentration de *SPI1* est retrouvée dans les cellules myéloïdes. Son expression augmente avec la différenciation du CMP vers le GMP, permettant la différenciation des monocytes/macrophages alors que de plus faibles niveaux supportent plutôt la production de granulocytes (Tenen 2003; Huang et al., 2008; Burda et al., 2010; Ramirez et al., 2010). Dans les leucémies monoblastiques, une réduction de l'ARNm de *SPI1* a été rapportée (D'Alo et al., 2008). Dans les leucémies avec fusion RUNX1-RUNX1T1, un mécanisme différent est cependant rapporté, impliquant plutôt une liaison de la chimère au domaine $\beta 3\beta 4$ de SPI1. Suite à cette interaction entre RUNX1-RUNX1T1 et SPI1, le co-activateur JUN ne peut plus interagir avec SPI1, causant une réduction de son pouvoir d'activation transcriptionnelle (Vangala et al., 2003). Puisque le gène *SPI1* est une cible directe de RUNX1 laquelle est activée dans les CSH puis dans les cellules myéloïdes CMP et

GMP, mais réprimée dans les MEP (Huang et al., 2008), son expression a donc été évaluée dans les cellules de spécimens de LAM présentant ou non un réarrangement de *RUNXI* incluant le spécimen avec t(7;21)(p22;q22) afin de vérifier si cet important régulateur des lignées myéloïde et lymphoïde B était altéré sur le plan transcriptionnel et traductionnel.

D'abord, une qRT-PCR étudiant l'expression de l'ARNm de *SP11* a été réalisée dans les cellules de spécimens de leucémies primaires présentant une t(8;21)(q22;q22) ($n = 6$), une inv(16)(p13q22) ($n = 6$) ou une t(7;21)(p22;q22) ($n = 1$) et de moelles normales ($n = 3$) à l'aide d'amorces et de sondes ciblant les exons 1-2 et 3-4 du gène. L'expression a été comparée au gène contrôle *GAPDH* et à la moyenne des trois moelles normales servant de calibrateur. Aucune réduction d'expression de *SP11* n'a été détectée dans les cellules primaires du patient présentant la t(7;21)(p22;q22) ni dans aucun autre des échantillons leucémiques présentant une t(8;21)(q22;q22) ou une inv(16)(p13q22) (résultats non présentés). L'expression de *SP11* était similaire à l'expression moyenne de trois moelles normales, suggérant l'absence de dérégulation transcriptionnelle de *SP11* dans ces cellules.

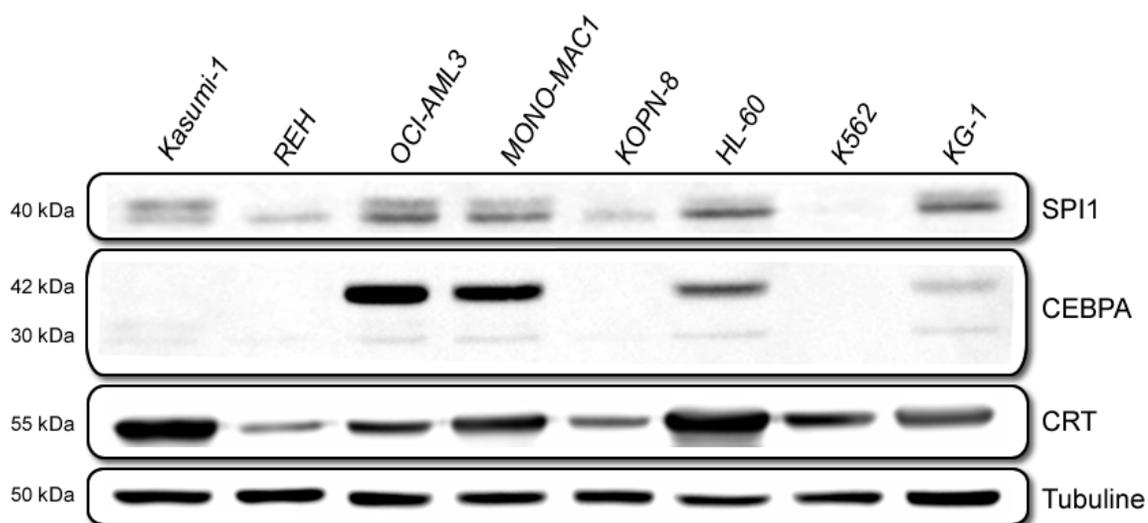


Figure 7.2. Expression des protéines SPI1, CEBPA et CRT dans les lignées leucémiques myéloïdes et lymphoïdes. Expression protéique de SPI1 (40 kDa), de CEBPA (32 et 40 kDa) et de CRT (55 kDa) dans les cellules des lignées de leucémies aiguës myéloïdes (Kasumi-1, OCI-AML3, MONO-MAC1, HL-60 et KG-1), de leucémie myéloïde chronique en phase blastique (K562) et de leucémies aiguës lymphoïdes B (REH et KOPN-8). La tubuline sert de contrôle de charge pour chacun des échantillons évalués.

L'expression protéique de SPI1 a ensuite été évaluée, parallèlement à l'expression des protéines CEBPA et CRT, dans les lignées leucémiques puis a été étudiée dans les spécimens de leucémies primaires. Une faible expression de SPI1 a été détectée dans les deux lignées de LAL-B étudiées par rapport aux lignées de LAM (REH et KOPN-8 versus Kasumi-1, HL-60, OCI-AML3, MONO-MAC1 et KG-1), confirmant les résultats publiés antérieurement (Fig. 7.2) (Back et al., 2005; Ramirez et al., 2010). Dans la lignée de LMC-PB K562, une absence ou une très faible expression de la protéine SPI1 a été observée, étant également conforme avec la littérature (Fig. 7.2) (Perrotti et al., 2002;

Tenen 2003). Enfin, une réduction de SPI1 a été observée dans la lignée Kasumi-1 par rapport aux autres lignées myéloïdes.

Pour ce qui est de la protéine CEBPA, aucune expression n'a été détectée dans les lignées de LAL-B étudiées et dans les lignées K562 et Kasumi-1, tel que rapporté (Fig. 7.2) (Pabst et al., 2001; Cilloni et al., 2003; Schuringa 2010). Cependant, une expression de CEBPA a été notée dans les autres lignées étudiées dérivant de néoplasies de la lignée myéloïde (forte expression : OCI-AML3 et MONO-MAC1 ; faible expression : HL-60 et KG-1).

Afin de pouvoir interpréter les variations d'expression de CEBPA retrouvées dans les lignées K562, Kasumi-1, HL-60 et KG-1, l'expression de la protéine CRT a été étudiée. Une expression augmentée de CRT a été observée dans les lignées Kasumi-1 et HL-60, pouvant expliquer une absence ou une faible expression de CEBPA dans ces lignées (Fig. 7.2). Dans la lignée K562, l'expression de CRT était toutefois semblable à celle détectée dans les lignées de leucémies myéloïdes OCI-AML3, MONO-MAC1 et KG-1 (Fig. 7.2), appuyant plutôt un rôle rapporté pour la protéine hnRNP E2 dans les cas de LMC-PB (Perrotti et al., 2002).

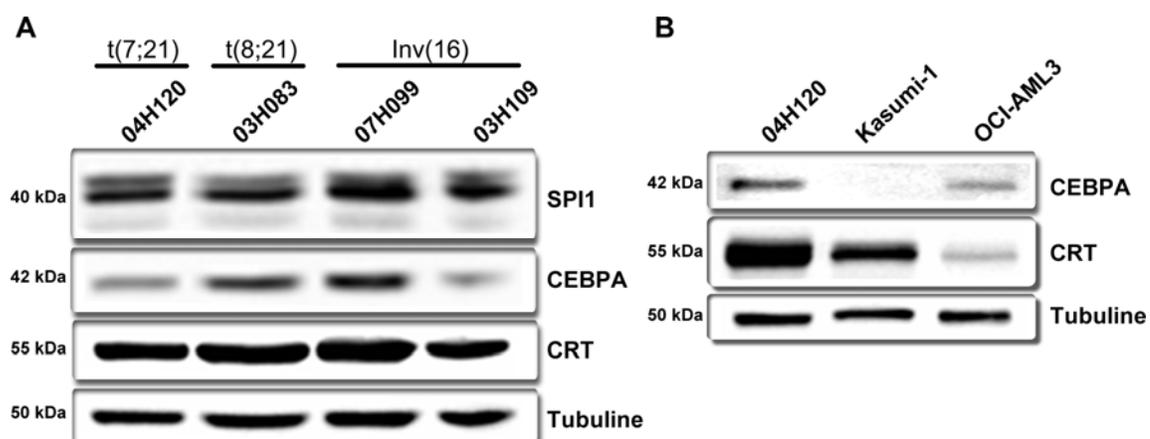


Figure 7.3. Expression des protéines CEBPA, CRT et SPI1 dans les cellules mononuclées isolées de spécimens primaires et de lignées de leucémie aiguë myéloïde. (A) Expression protéique de SPI1 (40 kDa), de CEBPA (42 kDa) et de CRT (55 kDa) dans les cellules primaires du patient 04H120 avec t(7;21)(p22;q22), du patient 03H083 avec t(8;21)(q22;q22) et des patients 07H099 et 03H109 avec inv(16)(p13q22). (B) Expression protéique de CEBPA et de CRT dans les cellules du patient 04H120 et dans les cellules des lignées Kasumi-1 et OCI-AML3.

Une expérience similaire a été initiée sur les protéines totales extraites de quatre spécimens primaires de LAM afin d'étudier les variations d'expression des protéines SPI1, CEBPA et CRT sur le plan traductionnel. Concordant avec les résultats de qRT-PCR suggérant une expression de l'ARNm de *SPI1*, de *CEBPA* et de *CRT* dans les cellules du spécimen avec t(7;21)(p22;q22), une expression des protéines SPI1, CEBPA et CRT a aussi été retrouvée (Figs. 7.3A-7.3B). Une expression similaire des protéines CEBPA, CRT et SPI1 a aussi été détectée dans trois autres spécimens primaires étudiés par western blot (Fig. 7.3A). Malgré des charges qui ne sont pas parfaitement équivalentes, les résultats d'une seconde expérience confirment que la protéine CEBPA

est exprimée dans les cellules du patient avec t(7;21)(p22;q22) ainsi que dans les cellules de la lignée OCI-AML3 alors qu'aucune expression n'est notée dans les cellules de la lignée Kasumi-1 (Fig. 7.3B). Une même comparaison par rapport aux cellules des lignées Kasumi-1 et OCI-AML3 a permis de révéler une expression nettement augmentée de la protéine CRT dans les cellules avec t(7;21)(p22;q22), supportant l'activation transcriptionnelle de *CRT* observée par qRT-PCR dans ces cellules (Figs. 7.1, 7.3B). Ces résultats devront être validés dans une plus grande série de cas avec t(7;21)(p22;q22).

Il est important de noter que les études protéiques sur des spécimens de leucémies primaires sont rares et réalisées sur un faible nombre d'échantillons ne permettant pas de révéler adéquatement l'hétérogénéité de ces cas (composition cellulaire et pourcentage de blastes). Bien que notre série inclut des échantillons de leucémies avec un pourcentage élevé de blastes (Table 2.9 ; le pourcentage indiqué correspond à celui noté à l'analyse morphologique avant la séparation par le Ficoll), la protéine CEBPA a été détectée dans chacun des spécimens étudiés avec t(8;21)(q22;q22) et avec inv(16)(p13q22) à l'aide d'un anticorps ciblant la région N-terminale de cette protéine. Ces résultats contrastent avec ceux rapportés dans la littérature [3 cas de LAM M2 avec t(8;21)(q22;q22) et 12 cas de LAM M4Eo avec inv(16)(p13q22) rapportés] (Pabst et al., 2001; Helbling et al., 2005). Toutefois, un anticorps différent reconnaissant la région interne de CEBPA a été utilisé dans ces études.

7.3 Étude d'expression des composantes de la voie Wnt dans les lignées de cancers hématologiques et les leucémies primaires avec anomalies de *RUNX1*

Afin de poursuivre notre étude des profils transcriptionnels des fusions *RUNX1*, nous nous sommes intéressées à la voie canonique de signalisation Wnt laquelle est activée dans les CSH et dans les néoplasies hématologiques par divers mécanismes (Mikesch et al., 2007). La voie Wnt est initiée par la liaison des protéines Wnt à un complexe récepteur composé d'un membre de la famille FZ « Frizzled » et de son co-récepteur LRP5/6 « lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6 ». Lorsque la voie est activée, une cascade intracellulaire permet l'inactivation du complexe inhibiteur formé de l'axin, de l'APC et des kinases CK1 et GSK3 β , ce qui mène ultimement à l'accumulation cytoplasmique de la β -catenine non-phosphorylée (CTNNB1). La CTNNB1 non-phosphorylée peut alors transloquer au noyau où elle servira de co-activateur auprès du complexe de transcription TCF « T-cell factor »/LEF1 « lymphoid enhancer-binding factor 1 ». Ce complexe a pour fonction de réguler une variété de cibles dont *MYC*, la cycline D1 (*CCND1*), la cycline D2 (*CCND2*) et la survivine (*BIRC5*) (Figs. 7.4A-7.4B) (Staal and Clevers 2005).

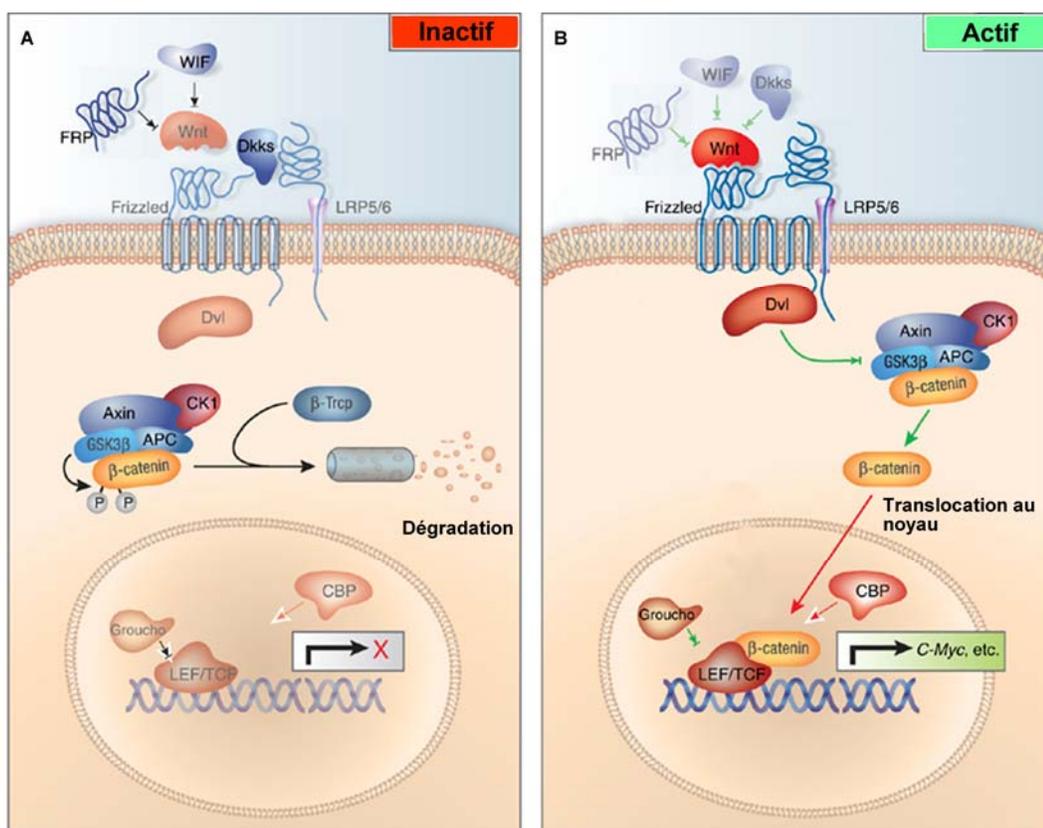


Figure 7.4. Voie de signalisation canonique Wnt. (A) Voie Wnt inactive. Le complexe inhibiteur Axin/APC/GSK3 β s'associe à la β -caténine puis phosphoryle cette dernière, menant à sa dégradation par le protéasome. (B) Activation de la voie par la liaison d'une molécule Wnt à son récepteur et co-récepteur Frizzled/LRP5/6. La liaison permet l'inactivation du complexe inhibiteur et la stabilisation de la β -caténine cytoplasmique. La β -caténine non-phosphorylée peut alors transloquer au noyau et se lier à TCF/LEF afin de permettre l'activation des cibles dépendantes de cette voie. Figure reproduite et adaptée avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Lab Invest. Luo J et al.;87(2):97-103, copyright 2007.

Dans les LAM, l'ARNm de *CTNNB1* est significativement plus élevé que dans les LAL, les LMC/SMP de même que dans les progéniteurs hématopoïétiques normaux (Serinsoz et al., 2004; Minke et al., 2009). Une augmentation de l'expression protéique de

CTNNB1, à divers degrés, a également été détectée dans 61 % des cas de LAM (Ysebaert et al., 2006). La méthylation d'inhibiteurs de la voie a aussi été décrite dans 61-89 % des LAM (Griffiths et al., 2010; Hou et al., 2011). En somme, ces divers mécanismes employés par les cellules leucémiques démontrent l'existence de plusieurs stratégies menant à la dérégulation de la voie Wnt dans cette maladie.

Malgré l'importante fonction de la voie Wnt décrite dans l'hématopoïèse embryonnaire, il a été démontré que CTNNB1 n'est pas normalement activée dans les GMP et que ni CTNNB1 ni son homologue JUP (anciennement nommé γ -catenine ou plakoglobine) n'est essentiel à l'auto-renouvellement des CSH adultes normales (Jeannet et al., 2008; Wang et al., 2010). Grâce à la surexpression des gènes murins *Hoxa9* et *Meis1a* ou du gène de fusion *MLL-MLLT3/AF9* humain dans les cellules de moelle osseuse de souris, Wang et collaborateurs ont établi que cette voie était essentielle lors du processus de leucémogénèse. Cette équipe a démontré que la différence entre une cellule GMP-*Hoxa9/Meis1* incapable d'induire une leucémie dans un modèle murin et une cellule LSK-*Hoxa9/Meis1* ayant un potentiel transformant, résidait, entre autres, dans l'activation de CTNNB1 dans ces cellules LSK (Wang et al., 2010). Dans une autre étude chez la souris, une activation différentielle de la voie Wnt, traduite par une expression augmentée de CTNNB1, a aussi été observée entre les cellules Kit⁺ de moelle osseuse exprimant la fusion *MLL-ENL* suite à une transduction rétrovirale (cellules dites pré-leucémiques) et les cellules isolées d'une souris receveuse ayant acquis des événements génétiques additionnels (cellules leucémiques) (Yeung et al., 2010). Cette

équipe a aussi démontré la dépendance de la CSL à CTNNB1 grâce à une stratégie d'ARN interférence, permettant de démontrer l'importance de la voie Wnt dans les leucémies avec fusion *MLL-ENL* et de proposer CTNNB1 comme une nouvelle cible thérapeutique pour l'éradication des CSL dans ces LAM (Yeung et al., 2010). L'activation de CTNNB1 s'avère donc être une étape importante de la transformation pour certains types d'anomalies génétiques et une composante non essentielle au maintien de l'auto-renouvellement des CSH normales adultes. De façon intéressante, Tonks et collaborateurs ont démontré que l'expression de *RUNXI-RUNXIT1* dans des progéniteurs hématopoïétiques humains CD34⁺ purifiés à partir de cellules mononuclées de sang de cordon menait à l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes dont, entre autres, le gène *JUP* codant pour un homologue de CTNNB1 partageant 66 % d'homologie et 76 % de similarité avec ce dernier (Tonks et al., 2007).

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué certaines composantes de cette voie Wnt. Puisque *JUP* était rapporté comme une cible activée dans les leucémies avec fusion *RUNXI-RUNXIT1*, nous avons émis l'hypothèse que cette activation pourrait également s'observer dans des spécimens présentant d'autres fusions *RUNXI* malgré l'implication de partenaires variés. L'expression des gènes *JUP* et *MYC* a été étudiée parallèlement aux gènes *CEBPA* et *CRT* au sein de nos deux cohortes de patients (Annexe, tables 9.6-9.7) alors que l'expression des gènes *CTNNB1* et *CCND1* a été étudiée parallèlement à *JUP*, *MYC*, *CEBPA* et *CRT* dans la seconde cohorte uniquement (Annexe, table 9.7).

Les statistiques ont été effectuées sur les données de l'étude de validation (seconde expérience) à l'aide du test non-paramétrique Mann-Whitney.

	<i>RUNXI</i> <i>n</i> = 5	<i>t</i> (8;21) <i>n</i> = 10	<i>inv</i> (16) <i>n</i> = 7	NK <i>n</i> = 15
<i>CEBPA</i>	2,49	3,08	3,57	8,64
<i>CRT</i>	0,85	2,25	1,88	2,02
<i>JUP</i>	7,09	19,74	7,97	2,16
<i>CTNNB1</i>	1,73	2,83	1,96	2,19
<i>MYC</i>	0,69	1,48	1,19	0,61
<i>CCND1</i>	4,57	3,47	0,39	0,65

Table 7.2. Valeurs moyennes de quantification relative obtenues pour les gènes *CEBPA*, *CRT*, *JUP*, *CTNNB1*, *MYC* et *CCND1* pour chacun des quatre principaux groupes de leucémies analysés dans l'étude de validation. *RUNXI*, patients avec anomalies plus rares de *RUNXI* ; *t*(8;21), patients avec *t*(8;21)(q22;q22) ; *inv*(16), patients avec *inv*(16)(p13q22) ; NK, patients avec caryotype normal.

Une importante surexpression de *JUP*, concordant avec la littérature, a d'abord été détectée dans le groupe de leucémies avec *t*(8;21)(q22;q22) ($RQ_{t(8;21)} = 19,74$ versus $RQ_{NK} = 2,16$; $p = 0,0001$) et a ensuite été validée dans la seconde étude (Fig. 7.6A, tables 7.1-7.2) (Muller-Tidow et al., 2004; Tonks et al., 2007). Une surexpression de *JUP* a également été observée dans le groupe de LAM avec *inv*(16)(p13q22) ($RQ_{inv(16)} = 7,97$ versus $RQ_{NK} = 2,16$; $p = 0,0039$) (Fig. 7.5A). De façon intéressante, trois des cinq spécimens ayant une anomalie plus rare de *RUNXI* incluant les échantillons avec *t*(7;21)/*USP42*, *t*(8;21)/*TRPS1* et *t*(15;21)/*SV2B* surexpriment aussi *JUP* avec un RQ supérieur à 10 ($RQ_{t(7;21)} = 10,19$; $RQ_{t(8;21)} = 10,35$; $RQ_{t(15;21)} = 10,13$) alors que les spécimens avec *t*(1;21)/*PRDM16* et *t*(1;21)/*CLCA2* présentent un RQ à

2,75 et 2,03 respectivement. Lorsque les cinq spécimens avec anomalies plus rares de *RUNXI* sont regroupés, une différence significative d'expression est détectée entre ce groupe et le groupe de LAM NK ($n=15$) ($RQ_{RUNXI} = 7,09$ versus $RQ_{NK} = 2,16$; $p = 0,0114$). Cette différence est d'autant plus significative lorsque tous les spécimens avec une anomalie ciblant *RUNXI* [t(8;21)(q22;q22) et anomalies plus rares ; $n = 15$] sont regroupés et comparés au groupe de LAM NK ($RQ_{21q22} = 15,53$ versus $RQ_{NK} = 2,16$; $p < 0,0001$). Enfin, une surexpression de *JUP* a été observée dans les cellules de la lignée Kasumi-1 ainsi que dans les cellules de la lignée de LAL-B REH (Fig. 7.5A).

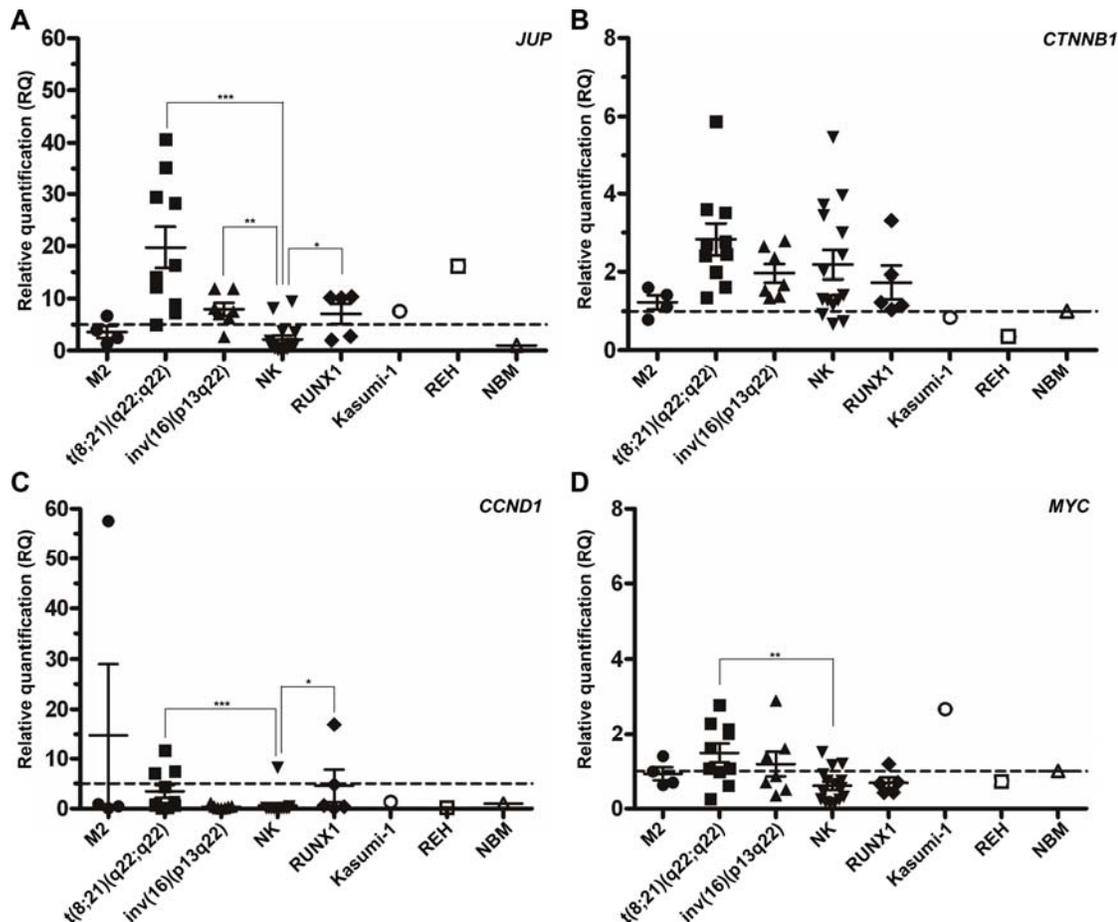


Figure 7.5. Expression de quatre composants de la voie Wnt (*JUP*, *CTNNB1*, *CCND1* et *MYC*) dans des leucémies primaires, lignées leucémiques et moelles normales. (A) Une différence significative de l'expression de *JUP* est observée entre le groupe de LAM NK et les groupes de LAM avec t(8;21) (***, $p = 0,0001$), de LAM avec inv(16)(p13q22) (**, $p = 0,0039$) et de leucémies avec anomalies plus rares de *RUNX1* (*, $p = 0,0114$), selon le test Mann-Whitney. La ligne pointillée indique le seuil de surexpression utilisé (RQ = 5) (B) Aucune différence significative d'expression de *CTNNB1* est notée entre le groupe de LAM NK et les groupes de leucémies avec t(8;21), avec inv(16) ou avec anomalies plus rares de *RUNX1*. La valeur du calibrateur est représentée par une ligne horizontale pointillée. (C) Une différence d'expression significative de *CCND1* est observée entre le groupe de LAM NK et les groupes de LAM avec t(8;21) (***, $p = 0,0008$) et de leucémies avec anomalies plus rares de

RUNXI (*, $p = 0,0447$). La ligne pointillée indique le seuil de surexpression utilisé (RQ = 5). (D) Une différence d'expression significative de *MYC* est observée entre les groupes génétiques avec NK et avec t(8;21) (**, $p = 0,0071$). Aucune surexpression de *MYC* n'est observée dans les spécimens avec anomalies plus rares de *RUNXI* et la moyenne d'expression de ce groupe est comparable au calibrateur (NBM). La moyenne d'expression et le SEM « standard error of the mean » (barre d'erreur) sont représentés pour chaque groupe de leucémies. La valeur du calibrateur est représentée par une ligne horizontale pointillée.

Une différence d'expression a aussi été observée pour les gènes *CCND1* ($p = 0,0008$) et *MYC* ($p = 0,0071$) entre les groupes génétiques de LAM avec NK et avec t(8;21)(q22;q22) suggérant une activation transcriptionnelle de ces cibles dans les échantillons leucémiques avec fusion *RUNXI-RUNXIT1* (Figs. 7.5C-7.5D, tables 7.1-7.2). Dans le groupe de leucémies avec anomalies plus rares de *RUNXI*, l'expression de *MYC* n'est pas différente du calibrateur ni du groupe de LAM NK alors qu'une augmentation moyenne de l'expression de *CCND1* a été détectée (Figs. 7.5C-7.5D, table 7.2). Toutefois, la surexpression de *CCND1* a été observée pour deux des cinq spécimens présentant une anomalie plus rare de *RUNXI* ($RQ_{t(7;21)/USP42} = 16,98$ et $RQ_{t(1;21)/CLCA2} = 4,79$), expliquant la moyenne plus élevée dans cette population ($RQ_{RUNXI} = 4,57$ versus $RQ_{NK} = 0,65$; *, $p = 0,0447$). Par rapport à la moyenne des moelles normales, nous avons observé une expression près de deux fois plus élevée de l'ARNm de *CTNBI* dans chacun des quatre groupes génétiques étudiés [t(8;21), inv(16), NK, *RUNXI*], concordant avec la littérature sur ce sujet rapportant une

expression moyenne de *CTNNB1* deux fois plus élevée dans les LAM (Table 7.2) (Serinsoz et al., 2004).

Ces données nous permettent de proposer la présence d'une activation transcriptionnelle de *JUP* et de *CCND1* dans les leucémies présentant une fusion *RUNXI*. En effet, *JUP* est de 2 à 40 fois plus exprimé par rapport à la normale dans les spécimens avec anomalies du CBF, et ce, pour tous les spécimens étudiés. Malgré une activation moindre dans les spécimens avec anomalies plus rares de *RUNXI*, une expression de 2 à 10 fois supérieure à la normale est aussi présente dans tous ces spécimens. Pour *CCND1*, une surexpression de ce gène allant de 4 à 16 fois est observée dans quatre des dix cas avec $t(8;21)(q22;q22)$ et dans deux des cinq cas avec fusions plus rares de *RUNXI* alors qu'une surexpression n'est observée que dans deux des 25 autres spécimens de LAM sans anomalie de *RUNXI*. Ces résultats démontrant une hétérogénéité moléculaire des fusions *RUNXI* devront toutefois être confirmés dans un plus grand nombre de cas.

En conclusion, la dérégulation des cibles telles que *CEBPA* et *JUP* dans les spécimens avec anomalies récurrentes et plus rares de *RUNXI* suggère la présence de cibles communes et l'existence de profils de dérégulation partagés par les différentes fusions de *RUNXI*, et ce, malgré l'implication de partenaires variés au sein de ces fusions. Quoique ce ne soit pas encore démontré, les gènes *JUP* et *CEBPA* pourraient possiblement représenter des cibles directes du facteur de transcription *RUNX1*, expliquant ces profils de dérégulation communs à la majorité des spécimens étudiés

présentant une anomalie de ce gène. L'expression variable des gènes *MYC* et *CCND1* observée dans notre étude démontre aussi l'hétérogénéité moléculaire régnant au sein de ce groupe génétique et suggère un rôle joué par de possibles anomalies secondaires.

8. Discussion générale

La recherche de réarrangements chromosomiques et d'anomalies moléculaires dans les leucémies aiguës est un outil essentiel à l'établissement du diagnostic, à l'évaluation du pronostic et à la sélection des options thérapeutiques. Les translocations impliquant la bande chromosomique 21q22 ciblant le gène *RUNXI* sont fréquentes et identifiées dans une grande variété d'hémopathies malignes *de novo*, secondaires à la chimiothérapie ou en rechute, chez l'enfant comme chez l'adulte. Malgré la fréquence des anomalies de *RUNXI*, seules les translocations récurrentes de pronostic favorable t(8;21)(q22;q22) et t(12;21)(p13;q22) ainsi que la translocation récurrente de pronostic très défavorable t(3;21)(q26;q22) sont mieux caractérisées sur le plan clinique et moléculaire sur l'ensemble des 57 réarrangements de la bande 21q22 décrits à ce jour.

Les autres anomalies n'impliquant pas les gènes *RUNXIT1*, *ETV6* ou *EVII* sont des anomalies plus rares dont l'implication pathologique et la signification clinique restent indéterminées. Pour ces anomalies plus rares, les associations morphologiques et pronostiques ne peuvent pas être établies en raison du faible nombre de cas rapportés pour chacune d'elle. Dans ce manuscrit, nous avons présenté le profil clinique détaillé de quatre nouveaux cas de leucémie aiguë présentant une anomalie plus rare de la bande chromosomique 21q22 impliquant le gène *RUNXI*. Une caractérisation moléculaire complète a été présentée pour ces translocations, nous permettant de mettre en évidence deux nouveaux partenaires de fusion de *RUNXI* (*CLCA2* et *SV2B*) et de décrire la

réurrence des t(7;21)(p22;q22)/fusion *RUNX1-USP42* et t(8;21)(q23.3;q22)/fusion *RUNX1-TRPS1*. Pour ces deux derniers gènes de fusion, les mécanismes à l'origine de ces anomalies génétiques ont été étudiés, révélant l'implication probable d'un mode de recombinaison de type NHEJ. En raison de la composition différente des jonctions, la participation de composantes distinctes du NHEJ menant à la genèse de ces réarrangements est proposée. Enfin, l'étude de certaines cibles des fusions *RUNX1* a été réalisée, s'inscrivant à l'intérieur d'un projet visant à identifier des gènes communément dérégulés entre les anomalies récurrentes et plus rares de *RUNX1*. Cette étude nous a permis de mettre en évidence la dérégulation de plusieurs cibles, dont le gène *JUP* qui est surexprimé. Le partage d'au moins une cible commune par ces entités génétiques ouvre le chemin à l'identification de nouvelles options thérapeutiques pour ce grand groupe hétérogène de réarrangements et permet de proposer un rôle joué par la voie Wnt dans la pathogenèse des leucémies avec fusions *RUNX1*, tel que noté pour les leucémies avec fusions *MLL*.

8.1 Un large spectre de partenaires identifiés

À ce jour, des trente et un partenaires identifiés de *RUNX1*, neuf sont récurrents (29 %) et quatre sont plus fréquents (*RUNX1T1*, *ETV6*, *MECOM* et *RPL22/EAP* ; 12,9 %), laissant donc vingt-sept candidats dans la classe des partenaires plus rares . Lors de nos études de caractérisation, nous avons mis en lumière un réarrangement de quatre gènes appartenant à différentes familles de protéines. L'étude des gènes de fusion impliquant

des partenaires codant pour le facteur de transcription TRPS1, l'enzyme USP42 et les protéines membranaires CLCA2 et SV2B nous a permis de révéler l'existence d'au moins trois différents modes de dérégulation de *RUNXI* dans ces leucémies aiguës, démontrant la variété des mécanismes employés par une cellule afin d'altérer les fonctions de cet important régulateur de l'hématopoïèse.

Aucun système de classification des partenaires de *RUNXI* n'a encore été proposé jusqu'à maintenant. Or, pour le gène *MLL*, un système de classification faisant ressortir certaines particularités associées aux protéines impliquées dans une cinquantaine de fusions, en terme de fonction, de composition ou d'appartenance a été proposé il y a maintenant plusieurs années par Krivtsov et collaborateurs. Initialement, que dix-sept des partenaires de *MLL* ont été classés en fonction de leur localisation cellulaire (nucléaire ou cytoplasmique) et ont ensuite été divisés en quatre groupes [groupe 1 : protéines de liaison à l'ADN/protéines nucléaires, groupe 2 : présence d'un domaine d'oligomérisation « coiled-coil »/protéines cytoplasmiques, groupe 3 : famille des Septin/protéines cytoplasmiques, groupe 4 : histone acétyltransférase/protéines nucléaires] (Krivtsov et al., 2006). Par la suite, divers autres partenaires de *MLL* ont été découverts et étudiés sur le plan moléculaire, menant au développement d'un système de classification plus élaboré et complet. Ainsi, à l'aide de ce système, une vision plus globale des mécanismes de leucémogénèse associés aux fusions *MLL* a émergé (Meyer et al., 2009).

Afin de mieux comprendre le réseau de dérégulation complexe relié à *RUNX1*, nous avons d'abord répertorié les trente et un partenaires de translocations connus de ce gène. Grâce à notre travail de caractérisation et à une revue extensive de la littérature, nous proposons un premier système de classification des partenaires de fusion de *RUNX1*. Ce système reflète l'hétérogénéité de ce grand groupe génétique et permet de faire ressortir certaines similitudes réunissant quelques partenaires au sein de thématiques communes. Ainsi, les facteurs de transcription (11 partenaires ; 19,3 %), les enzymes (4 partenaires ; 7 %) et les protéines membranaires (4 partenaires ; 7 %) ressortent comme des catégories de partenaires plus fréquentes dont les fonctions dans le processus d'hématopoïèse normale et/ou leucémique demeurent peu explorées.

8.1.1 Les facteurs de transcription, la classe majoritaire des partenaires de *RUNX1*

Les gènes encodant les facteurs de transcription représentent la classe prédominante de partenaires de fusion de *RUNX1* dans les leucémies aiguës, par leur récurrence et leur incidence. Dans cette catégorie de partenaires nucléaires, *RUNX1T1*, *ETV6*, *MECOM*, *CBFA2T3*, *PRDM16* et maintenant *TRPS1* sont récurrents (Romana et al., 1995; Athanasiadou et al., 2010; Reikvam et al., 2011). Pour l'ensemble de ces réarrangements, des protéines chimériques sont attendues permettant la fusion des domaines de *RUNX1* aux domaines protéiques du facteur de transcription. À ce jour, aucune fusion « out-of-frame » ne produisant que des isoformes tronquées de *RUNX1*

n'a été décrite dans cette catégorie, témoignant de la contribution probable de ces partenaires au sein du processus de transformation.

Les facteurs de transcription partagent des motifs communs dont les domaines de liaison à l'ADN ainsi que les domaines de régulation transcriptionnelle permettant le recrutement de co-régulateurs nécessaires au pouvoir activateur ou répresseur. La dérégulation transcriptionnelle est un thème réunissant ces partenaires nucléaires et le recrutement de mêmes composantes par différents membres de cette catégorie ressort comme un élément central. Par exemple, pour les fusions MLL, il a été démontré que ses partenaires nucléaires récurrents formant le premier groupe (protéine ayant un domaine de liaison à l'ADN : AF4, AF9, AF10 et ENL) appartiennent à un même complexe protéique lequel est impliqué dans l'élongation transcriptionnelle par association au facteur d'élongation P-TEFb et/ou est associé à la méthylation des histones en position H3K79 (marque d'activation transcriptionnelle) par le recrutement de l'histone méthyltransférase hDOT1L (Biswas et al., 2011). L'étude de ces complexes a permis de mieux comprendre l'activation transcriptionnelle associée à certaines fusions MLL et d'expliquer, du moins en partie, l'expression augmentée des gènes *HOX* et *MEIS1* observée dans ces leucémies (Milne et al., 2010). D'autres composantes telles que Menin1, LEDGF et MYB sont également recrutées par la portion N-terminale de MLL laquelle est une région conservée par les chimères de fusion et le recrutement de ces protéines joue possiblement un rôle essentiel dans la transformation par les fusions MLL (Marschalek 2010). Ainsi, par l'identification des complexes protéiques associés à ces

chimères et par l'étude des interactions protéiques entre ses différents partenaires, un modèle expliquant le pouvoir oncogénique de certaines fusions MLL a vu le jour.

Toutefois, comparativement à MLL, les fusions RUNX1 ont été peu étudiées. Puisque la modulation du pouvoir transcriptionnel semble importante pour l'activité transformante de ces fusions, le recrutement de co-régulateurs et la capacité d'oligomérisation représentent des mécanismes d'intérêt pour ces fusions. Il a été démontré que les partenaires TRPS1, ZFPM2, MECOM et PRDM16 sont indépendamment capables de lier le co-répresseur CtBP alors que MECOM et RUNX1T1 partagent la capacité de recruter le co-activateur et l'histone acétyltransférase p300/CBP (Chakraborty et al., 2001; Wang et al., 2011a). Une capacité d'oligomérisation conférée par le domaine NHR2 ou par le motif en doigt de zinc du partenaire est également partagée par plusieurs fusions incluant RUNX1-RUNX1T1, ETV6-RUNX1, RUNX1-TRPS1 et RUNX1-MECOM. Ce pouvoir est aussi possiblement conféré par un même domaine NHR2 ou motif en doigt de zinc codé par les partenaires des fusions RUNX1-CBFA2T3, RUNX1-CBFA2T2, RUNX1-ZFPM2 et RUNX1-PRDM16 puisque ces domaines ont préalablement démontré un pouvoir d'oligomérisation chez un autre membre des familles ETO, GATA et EVI1 (Chan et al., 2005; Nitta et al., 2005; Asou et al., 2007; Morrow et al., 2007; Yan et al., 2009).

La fusion RUNX1-TRPS1 qui possède la capacité de recruter CtBP en plus de la capacité de dimérisation est un exemple parfait démontrant qu'une fusion impliquant un

facteur de transcription puisse être capable de réorganiser et de restructurer l'environnement protéique de RUNX1 afin d'inverser la balance transcriptionnelle au niveau d'un promoteur spécifique. En effet, il est accepté qu'une coopération entre RUNX1 et GATA1 est requise lors de la différenciation mégacaryocytaire normale et qu'une liaison de ces facteurs à l'ADN est nécessaire afin d'activer les gènes de la lignée mégacaryocytaire. Cette activation requiert l'activité de plusieurs composantes dont le facteur d'élongation P-TEFb et l'ARN polymérase II ainsi que d'autres facteurs de transcription afin de permettre la différenciation mégacaryocytaire (Goldfarb 2009; Tijssen et al., 2011). Dans des conditions pathologiques où TRPS1 est fusionné à RUNX1, la liaison aberrante des séquences consensus de *RUNX1* et de *GATA1* est permise grâce à la formation d'homodimères RUNX1-TRPS1 rendant le gène ciblé indépendant de l'activation par GATA1 et nouvellement dépendant du répresseur TRPS1. À elle seule, la chimère est théoriquement capable de lier l'ADN au niveau de ces deux sites de liaison d'une même cible modulant ainsi la chromatine au niveau de cette cible dépendante de RUNX1 et de GATA1. Un recrutement aberrant de protéines et une modification ultime de l'environnement local au niveau des cibles peut alors survenir, causant une expression aberrante des gènes essentiels à la différenciation mégacaryocytaire. De nombreuses évidences suggèrent que l'expression des gènes, dans un contexte spécifique, est contrôlée par un réseau de facteurs de transcription capables d'interaction et que de subtiles variations de « l'interactome » au sein de ces complexes influencent profondément les programmes d'expression causant possiblement une inversion de la balance transcriptionnelle (Lahlil et al., 2004; Goldfarb 2009; Tijssen et

al., 2011). La présence d'un domaine d'oligomérisation de type « coiled-coil » est une caractéristique unique de certains partenaires cytoplasmiques de MLL (EPS15, GAS7, EEN, AF6 et AFX ; groupe 2), suggérant que ce pouvoir d'oligomérisation pourrait également représenter un mécanisme leucémogénique essentiel des fusions RUNX1 (Krivtsov and Armstrong 2007).

Dans cette catégorie de partenaires, on note également le réarrangement fréquent de RUNX1 avec plusieurs membres d'une même famille, rappelant la troisième catégorie de partenaires de MLL (protéines appartenant à la famille Septin). Trois grandes familles de protéines nucléaires liant l'ADN ont été impliquées dans la pathogenèse des leucémies RUNX1, soit la famille ETO (RUNX1T1, CBFA2T3, CBFA2T2), la famille PRDM (MECOM, PRDM16) et la famille GATA (TRPS1, ZFPM2). Les familles GATA et PRDM possèdent des rôles directs dans la leucémogénèse appuyant qu'une dérégulation de différents membres d'une même famille puisse contribuer à la transformation leucémique. Par exemple, il est bien accepté que les enfants atteints du syndrome de Down aient 150 fois plus de chance de développer une leucémie myéloïde avant l'âge de cinq ans qu'un enfant normal et cette transformation est, en partie, attribuable aux mutations du gène *GATA1* identifiées chez ces patients (Fonatsch 2010). Le gène *GATA2* fait maintenant partie de la courte liste de gènes dont l'haploinsuffisance prédispose aux SMD/LAM (Hahn et al., 2011). De plus, certaines évidences permettent de suggérer une fonction oncogénique de TRPS1 dans le cancer du sein (Radvanyi et al., 2005), établissant des associations claires entre la perturbation de

la famille GATA et l'oncogenèse. La famille PRDM comprend également des oncogènes notoires dont le pouvoir transformant a été bien démontré (Morishita 2007). La récurrence de la plupart des partenaires de cette catégorie et la forte incidence de certaines de ces fusions témoignent en faveur d'un rôle important joué par les partenaires de type « facteur de transcription » dans la leucémogénèse des fusions *RUNXI*.

8.1.2 Les enzymes de déubiquitination, une famille récurrente de partenaires

Les enzymes de déubiquitination de la famille des USP ont récemment attiré énormément d'attention en raison de leur implication dans une vaste gamme de processus cellulaires. Dans les hémopathies malignes, deux membres de cette famille sont réarrangés de façon récurrente avec *RUNXI*. Malgré le nombre encore limité de cas, *USP42* représente, après *CBFA2T3* et conjointement avec *PRDM16*, le second gène partenaire le plus fréquent du groupe de partenaires plus rares de *RUNXI* avec sept cas présentant la fusion *RUNXI-USP42* rapportés à ce jour [1^{er} : *CBFA2T3* avec plus d'une vingtaine de cas (Park et al., 2010) et 2^e : *PRDM16* avec sept cas également (Sakai et al., 2005; Hazourli et al., 2006; Stevens-Kroef et al., 2006; Shing et al., 2007; Roche-Lestienne et al., 2008)]. De plus, vu la nature semi-cryptique de la t(7;21)(p22;q22), le nombre de cas avec cette anomalie est appelé à croître.

Le gène *USP16* a récemment été décrit comme un partenaire récurrent de fusion de *RUNX1* à la suite d'une inversion cryptique du chromosome 21 dans deux cas de LMMC transformée en LAM (Gelsi-Boyer et al., 2008). La fusion de l'exon 1 de *USP16* à l'exon 5 ou 7 de *RUNX1* (*5'USP16-RUNX1*) ne permet pas l'expression d'une protéine chimérique puisqu'aucun site d'initiation de la traduction de *USP16* (localisé dans l'exon 2) ou de *RUNX1* (localisé dans les exons 1 et 3) n'est présent au sein de ce gène chimérique. Cette fusion mène plutôt à l'expression présumée de formes tronquées de *RUNX1* qui ne conservent que le domaine TAD/ID et qui s'expriment à partir des codons d'initiation alternatifs de *RUNX1* localisés au sein des exons 5 à 8 du gène. Par ailleurs, une région de « copy number alterations » ou CNA ciblant le gène *USP10*, codant pour un autre enzyme de cette famille impliqué dans la voie p53/MDM2, a aussi été décrit dans plusieurs cas de LAM (Walter et al., 2009; Yuan et al., 2010). *USP10* a aussi été identifié au sein d'une fusion avec le gène *ZDHHC7* (*5'USP10-ZDHHC7*) dans la lignée de cancer de la prostate VCaP (Maher et al., 2009a; Maher et al., 2009b). La surexpression de *USP42* et de *USP6* détectée dans les leucémies myéloïdes évaluées lors de ce travail (voir section 3.9) ainsi que la récurrence des fusions *RUNX1-USP42/t(7;21)(p22;q22)* et *USP16-RUNX1/inv(21)(q21.3q22.12)* dans les LAM/SMD et LMMC respectivement soulignent le rôle potentiel de ces enzymes dans la pathogenèse des néoplasies myéloïdes. Ceci demeure toutefois à évaluer sur le plan fonctionnel. D'autres protéines ayant une activité catalytique dont l'antioxydant PRDX4 et l'*O*-acétyl-ADP-ribose déacétylase MACROD1/LRP16 sont aussi fusionnées à *RUNX1* chez des patients atteints de LAM (Zhang et al., 2004; Imagama et al., 2007).

Les enzymes possèdent une capacité d'interagir avec une variété de substrats et peuvent réaliser de multiples interactions transitoires. Lorsque fusionnés à RUNX1, ces enzymes peuvent servir d'intermédiaire afin de recruter une toute nouvelle gamme de protéines capables d'interagir et/ou de modifier ce régulateur essentiel. De façon intéressante, des évidences suggèrent que les enzymes USP16 et USP10 peuvent modifier le statut d'ubiquitination de l'histone H2A affectant ainsi l'activité transcriptionnelle (Joo et al., 2007; Draker et al., 2011). Puisque l'environnement protéique est critique aux fonctions de RUNX1, les multiples interactions qu'il réalise sont déterminantes afin de régir son pouvoir d'activateur ou de répresseur. Les enzymes p300/CBP ainsi que ACACA, CBL, GMPS et UBE4A, lesquels sont des partenaires cytoplasmiques ayant une activité catalytique et une fonction dans le métabolisme, sont quelques partenaires de MLL partageant avec les USP un pouvoir catalytique (Krivtsov and Armstrong 2007; Meyer et al., 2009). Les enzymes sont des alliés intéressants dans le processus de leucémogénèse associé à RUNX1 ainsi qu'à MLL et représentent des cibles thérapeutiques potentielles dont l'inhibition soulève un intérêt marqué dans le traitement des leucémies, tel que démontré par le succès des inhibiteurs des tyrosines kinases dans le traitement des LMC et des LAL avec fusion *BCR-ABL1* et des NMP avec anomalies du *PDGFR* (*PDGFRB*, *PDGFRA*).

8.1.3 Les protéines membranaires, une classe émergente de partenaires

La caractérisation moléculaire des t(1;21)(p22;q22) et t(15;21)(q26;q22) a révélé le réarrangement de deux nouveaux gènes codant pour des protéines exprimées à la surface cellulaire : *CLCA2* et *SV2B*. Ces récents partenaires ainsi que *KCNMA1/t(10;21)(q22;q21)* et *CPNE8/t(12;21)(q12;q21)* appartiennent à une catégorie émergente de gènes codant pour des protéines membranaires lesquelles sont activées ou sensibles à la régulation par le calcium. De façon intéressante, ces quatre fusions engendrent uniquement des protéines tronquées de RUNX1 dû à la nature « out-of-frame » de ces fusions. *CLCA2*, *SV2B*, *KCNMA1* et *CPNE8* sont des protéines associées à des fonctions de régulation du trafic membranaire par le contrôle des ions tels que le chlore (Cl^-), le potassium (K^+) et le calcium (Ca^{2+}). La régulation des concentrations ioniques est essentielle au bon fonctionnement cellulaire et à la réalisation des processus clés qui dépendent de cette balance ionique tel que l'apoptose et la prolifération cellulaire.

Il a été démontré qu'un déplacement des ions chlorures vers le compartiment extracellulaire mène à un rétrécissement de la cellule et à une acidification du cytosol. Pour rétablir l'équilibre ionique, une expulsion d'ions K^+ survient, ce qui contribue également au rétrécissement et à l'acidification de la cellule. Le déséquilibre ionique engendré favorise ensuite l'entrée des ions Ca^{2+} dans le cytoplasme menant à l'activation de l'apoptose (Kunzelmann 2005; Lang et al., 2005; Lang et al., 2007). En effet, l'apoptose peut être déclenchée par divers stimuli incluant l'activation des récepteurs de

mort cellulaire et l'entrée massive de Ca^{2+} par les canaux calciques de la membrane plasmique ou par le relâchement de Ca^{2+} via le réticulum endoplasmique. Une activité anormale des canaux à ions pourrait donc être capable de contrecarrer la mort programmée et pourrait supporter la prolifération d'une cellule cancéreuse par un contrôle aberrant de cette balance ionique. Un déséquilibre des ions K^+ ou d'ions Cl^- , par inactivation des protéines KCNMA1 ou CLCA2 suite aux fusions « out-of-frame » de RUNX1, représente un mécanisme possible qui pourrait être utilisé par la cellule anormale afin d'échapper au contrôle anti-tumoral.

Notons que parmi les 21 spécimens de LAM étudiés par RT-PCR (section 4.5), 14 d'entre eux n'exprimaient pas ou présentaient une faible expression du gène *CLCA2* par rapport aux moelles normales étudiées. Malgré une expression augmentée du gène détectée dans les cellules du patient présentant la fusion *RUNX1-CLCA2*, celle-ci ne permet probablement pas l'expression de la protéine CLCA2 dû à sa nature « out-of-frame ». Des évidences dans le cancer du sein, dans le cancer colorectal et dans le lymphome du manteau permettent effectivement de réconcilier la perte d'expression de *CLCA2* avec la tumorigenèse. Ce gène pourrait donc potentiellement posséder une fonction de suppresseur de tumeur dans les cellules du spécimen présentant la $t(1;21)(p22;q22)$ et dans les cellules des spécimens de LAM étudiés.

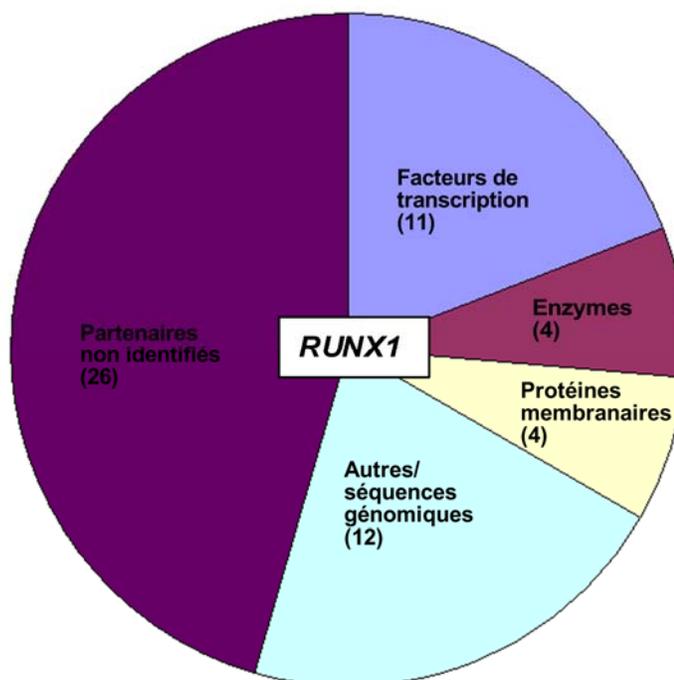


Figure 8.1. Identification de cinq classes de partenaires des fusions *RUNX1*. Au total, 57 loci génomiques sont fusionnés à *RUNX1*, dont trente et un partenaires ont été identifiés. Les facteurs de transcription regroupent 11 partenaires, la catégorie des enzymes en rassemble 4, le groupe codant pour des protéines membranaires contient 4 gènes alors que la classe des partenaires « autres » comprend 7 gènes et 5 séquences d'ADN dont les fonctions ne sont pas connues ou sont encore mal étudiées.

8.2 Premier système de classification des partenaires de *RUNX1*

Notre travail de caractérisation moléculaire, réalisé parallèlement à une revue extensive de la littérature, nous a permis d'élaborer un premier système de classification des trente et un gènes partenaires actuels de *RUNX1* (54,4 % des partenaires identifiés) (Fig. 8.1 ; table 8.1). Cinq grandes catégories de partenaires ont été déterminées à la lumière de nos

connaissances actuelles : les facteurs de transcription, les enzymes, les protéines membranaires, les protéines autres/séquences génomiques et les partenaires non identifiés (45,6 %) (Mathew et al., 2000; Richkind et al., 2000; Cherry et al., 2001; Paulien et al., 2002; Slovak et al., 2002; Jeandidier et al., 2006; Agerstam et al., 2007; Dai et al., 2007; Grossmann et al., 2010; Angelova et al., 2011; De Braekeleer et al., 2011; Grossmann et al., 2011b). Ce premier système est appelé à évoluer et à se raffiner en fonction des découvertes qui seront faites. Un système de classification adapté devra être proposé lorsque la localisation cellulaire, la fonction et la composition en domaine protéique de chacun des partenaires seront identifiées.

No.	Classe de partenaire	Famille	Fréquence	Maladies associées	Références
Facteurs de transcription					
1	1p36.32 <i>PRDM16</i>	Famille PRDM	7 fusions démontrées	LAM, t-LAM, LMC-PB, t-LAL, LAM, t-SMD	Sakai 2005; Stevens-Kroef 2006; Hazourli 2006; Roche-Lestienne 2008; Nguyen 2006
2	1q21.2 <i>ZNF687</i>	Famille de protéines à doigt de zinc de type C2H2	1 fusion démontrée		
3	2q11.2 <i>AFF3/LAF4</i>	Famille AFF	1 fusion démontrée	LAL-T	Chinen 2008
4	3q26.2 <i>MECOM/MDS1-EVII</i>	Famille PRDM	1% des LAM	LMC-BP, LAM, SMD, t-SMD/LAM	Lugthart 2010
5	8q21.3 <i>RUNX1/ETO</i>	Famille ETO	7% des LAM	LAM, t-LAM/SMD	Reikvam 2011
6	8q23.1 <i>ZFPM2/FOG2</i>	Famille FOG "Friend of GATA"	1 fusion démontrée	SMD	Chan 2005
7	8q23.3 <i>TRPS1</i>	Famille GATA	2 fusions démontrées	LAM rechute	Asou 2007, cas no.3
8	12p13.2 <i>ETV6/TEL</i>	Famille ETS	25% des LAL	LAL-B, MPAL	Romana 1995; Golub 1995; Gerr 2010
9	16q24.3 <i>CBFA2T3/MTG16</i>	Famille ETO	20 fusions démontrées	t-LAM, LAM	Athanasidou 2010
10	20q11.2 <i>CBFA2T2/MTGR1</i>	Famille ETO	1 fusion démontrée	LAM	Guastadusegni 2010
11	20q13.2 <i>ZFP64</i>	Protéine a doigt de zinc	1 fusion démontrée	LMMC	De Braekeleer 2011
Enzymes					
12	7p22.1 <i>USP42</i>	Famille ubiquitin specific peptidase	7 fusions démontrées	SMD, LAM	Paulson 2007; Foster 2010; Giguere 2011 (cas no.1)
13	21q22 <i>USP16</i>	Famille ubiquitin specific peptidase	2 fusions démontrées	LMMC	Gelsi-Boyer 2008
14	Xp22 <i>PRDX4</i>	Famille peroxiredoxin, enzyme antioxydant	1 fusion démontrée	LAM	Zhang 2004
15	11q13 <i>MACROD1/LPR16</i>	Famille à domaine MACRO	1 fusion démontrée	LAM	Imagama 2007
Protéines membranaires					
16	1p22.3 <i>CLCA2</i>	Famille "Calcium-activated chloride channel"	1 fusion démontrée	t-LAM	Nadal 2008; Giguere 2010 (cas no.2)
17	10q22.3 <i>KCNMA1</i>	Famille "Calcium-activated potassium conductance channel"	1 fusion démontrée	LAM	Grossman 2011
18	12q12 <i>CPNE8</i>	Famille Copine "Ca2+-dependent and phospholipid-binding proteins"	1 fusion démontrée	t-LAM	Ramsay 2003
19	15q26.1 <i>SV2B</i>	Famille SV2	1 fusion démontrée	MPAL	cas no.4
Protéines autres et séquences génomiques					
20	1p35.3 <i>YTHDF2</i>	Famille à domaine YTH	1 fusion démontrée	LAM	Nguyen 2006
21	4q31 <i>SH3D19</i>	Famille à domaine SH3	1 fusion démontrée	LAL-T?, LAM	Nguyen 2006
22	11q12 <i>LPXN</i>	Famille paxilin	1 fusion démontrée	LAM	Dai 2009
23	3q26.2 <i>RPL22L1/EAP</i>	Famille de protéines ribosomales L22	1% des LAM	LMC-BP, LAM, SMD, t-SMD/LAM	Lugthart 2010
24	4q28 <i>FGA7</i>	Nouveau gène	1 fusion démontrée	LAL-T	Mikhail 2004
25	19q13.43 <i>AMP19</i>	Nouveau gène	1 fusion démontrée	SMD→t-LAM	Hromas 2001
26	20q11.2 <i>C20orf112</i>	ARN non-codant	1 fusion démontrée	LMC-PB?, LAM	Jeandidier 2006; Guastadusegni 2010
27	5q13.3 Gène inconnu	Séquence génomique	1 fusion démontrée	SMD→LAM?, LMMC?, LAM	Grossman 2011
28	9q34.3 Gène inconnu	Séquence génomique	1 fusion démontrée	MPN→LAM	Agerstam 2007
29	10q22 Gène inconnu	Séquence génomique	1 fusion démontrée	LAM	Grossman 2011
30	17q21 Gène inconnu	Séquence génomique	1 fusion démontrée	LAM	Grossman 2011
31	Xp11.23 Gène inconnu	Séquence génomique	1 fusion démontrée	LMC-PB?, LMMC	Jeandidier 2006; Grossman 2010
Partenaires non identifiés					
32	1p32 Non identifié	Non identifié	-	t-LAM	Cherry 2001
33	1q12 Non identifié	Non identifié	-	LAM	Dai 2007
34	2p21 Non identifié	Non identifié	-	LMC→LAM	Jeandidier 2006
35	2p11.2 Non identifié	Non identifié	-	LAM	Richkind 2000
36	2q21 Non identifié	Non identifié	-	LAM	Slovak 2002
37	3p12 Non identifié	Non identifié	-	LAM	Jeandidier 2006
38	3q21 Non identifié	Non identifié	-	LALs	Jeandidier 2006
39	3q26 Non identifié	Non identifié	-	LAM	De Braekeleer 2011
40	4q21 Non identifié	Non identifié	-	t-SMD→t-LAM	Slovak 2002
41	4q35 Non identifié	Non identifié	-	LAM	Jeandidier 2006
42	6p22 Non identifié	Non identifié	-	t-SMD	Mathew 2000
43	7p12-p13 Non identifié	Non identifié	-	LAL	Jeandidier 2006
44	7p14-p15 Non identifié	Non identifié	-	LAMs	Jeandidier 2006
45	7p15 Non identifié	Non identifié	-	LAM	Jeandidier 2006
46	7q32 Non identifié	Non identifié	-	LAM	Angelova 2011
47	8q13 Non identifié	Non identifié	-	t-LAM	Slovak 2002
48	9p21-22 Non identifié	Non identifié	-	LAL, t-LAM	Slovak 2002
49	9q13 Non identifié	Non identifié	-	LAM	Paulien 2002
50	10q21 Non identifié	Non identifié	-	LAM	Slovak 2002
51	12q24 Non identifié	Non identifié	-	SMD, SMD→LAM	Slovak 2002
52	14q13 Non identifié	Non identifié	-	t-SMD→t-LAM	Slovak 2002
53	14q22 Non identifié	Non identifié	-	t-SMD→t-LAM	Slovak 2002
54	14q24 Non identifié	Non identifié	-	SMD	Slovak 2002
55	15q22 Non identifié	Non identifié	-	LAM, t-SMD→t-LAM	Slovak 2002
56	17q11 Non identifié	Non identifié	-	LAM, t-LAM, SMD→LAM	Slovak 2002
57	18q21 Non identifié	Non identifié	-	SMD→LAM	Slovak 2002

Table 8.1. Classification des 57 loci génomiques réarrangés avec *RUNX1*. La localisation génomique, la nomenclature HUGO des partenaires, la fréquence des fusions et les maladies associées à chaque translocation sont indiquées pour chacun des partenaires. L'absence de caractérisation moléculaire chez plusieurs patients rend incertaines les associations proposées avec quelques maladies (symbole ?). LAM, leucémie aiguë myéloïde ; t-LAM, leucémie aiguë myéloïde secondaire à un traitement ; LMC-PB, leucémie myéloïde chronique en phase blastique ; LAL-T, leucémie aiguë lymphoblastique de la lignée T ; SMD, syndrome myélodysplasique ; t-SMD/LAM, syndrome myélodysplasique et/ou LAM secondaire à un traitement ; LAL-B, leucémie aiguë lymphoblastique de la lignée B ; MPAL, leucémie aiguë à phénotype mixte ; LMMC, leucémie myélomonocytaire chronique ; →, progression vers ; MPN, néoplasie myéloproliférative.

8.3 Implication du mécanisme NHEJ dans les translocations

t(7;21)(p22;q22) et t(8;21)(q23.3;q22)

L'étude de la formation des translocations chromosomiques est un domaine d'intérêt permettant de révéler les mécanismes de formation de ces anomalies. Depuis plusieurs années, la recombinaison de type NHEJ a été proposée dans la genèse des translocations et ce type de mécanisme a principalement été incriminé lors des réarrangements du gène *MLL*. Cependant, très peu d'études ont été réalisées sur les mécanismes à l'origine des réarrangements du gène *RUNX1*. Dans le cadre de ce projet, les jonctions génomiques des translocations récurrentes t(7;21)(p22;q22) (cas 04H120) et t(8;21)(q23.3;q22) (cas 10H006) ont été étudiées, révélant l'existence d'un mécanisme distinct étant possiblement à l'origine de ces deux anomalies génétiques.

Le large intron 6 de *RUNXI* (34,9 kb) se divise plus précisément en intron 6 proprement dit et en intron 7a (22,2 kb). L'étude des introns 7a et 7b de *RUNXI*, où réside respectivement les cassures des t(8;21)(q23.3;q22) et t(7;21)(p22;q22), nous a permis d'identifier un possible BCR de moins de 2,7 kb et de 1 kb à l'intérieur de chacun de ces introns. D'abord, le point de cassure du cas 10H006 présentant la t(8;21)(q23.3;q22) a été identifié à une distance de 2,7 kb du point de cassure d'une seconde LAM *de novo* présentant une t(20;21)(q11;q22) aussi répertorié dans l'intron 7a (Guastadisegni et al., 2010). La proximité de ces deux points de cassure dans la partie terminale de l'intron 7a ainsi que la description d'autres sites de cassures de translocations impliquant *RUNXI* dans cette même région [exemple : t(3;21)(q26;q22), t(5;21)(q13;q22) et t(12;21)(q24;q22)] suggèrent une possible sensibilité aux bris et une incidence de recombinaison augmentée dans cette région plus spécifique (Fig. 8.2) (Zhang and Rowley 2006). Un BCR de moins de 1 kb a également été identifié dans l'intron 7b de *RUNXI* (6,7 kb) lors de la mise en commun des points de cassure du cas 04H120 présentant la t(7;21)(p22;q22) et du cas rapporté par Paulsson et collaborateurs présentant aussi une t(7;21)(p22;q22). Un troisième site de cassure, cloné au sein d'une LAL-T avec une t(2;21)(q11;q22), a été identifié à l'intérieur de cette région même de l'intron 7b, à environ 545 pb de notre point de cassure (Fig. 8.2) (Chinen et al., 2008). Vu ce regroupement intéressant des cassures au sein de ces deux larges introns, nous avons émis l'hypothèse que des éléments favorisant l'introduction de bris, tels que des sites TOP2, puissent être identifiés dans ces régions d'ADN génomique.

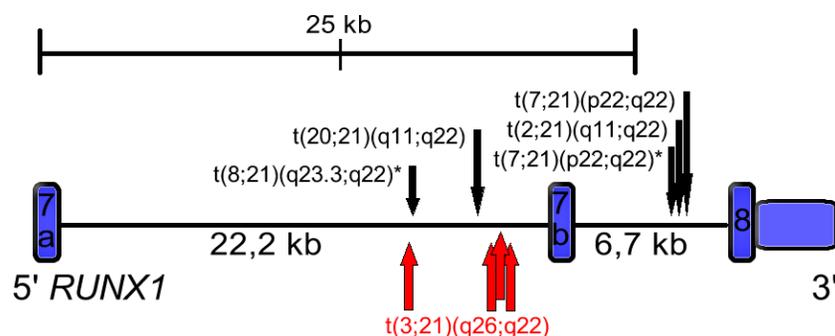


Figure 8.2. Représentation schématique des points de cassures rapportés dans les introns 7a et 7b de *RUNX1*. Positionnement des points de cassure génomiques des translocations rares $t(8;21)(q23.3;q22)$ (cas no.3), $t(20;21)(q11;q22)$ (Guastadisegni et al., 2010), $t(2;21)(q11;q22)$ (Chinen et al., 2008) et $t(7;21)(p22;q22)$ (Paulsson et al., 2006; Giguere and Hebert 2011). Dans la région terminale de l'intron 7a, les points de cassures d'au moins quatre patients présentant une $t(3;21)(q26;q22)$ sont représentés (flèches rouges), basé sur le schéma fourni par Zhang et Rowley (DNA repair 2006). Les boîtes bleues et les lignes foncées représentent respectivement les exons codants et les introns de *RUNX1* alors que les flèches noires indiquent la position approximative des points de cassures rapportés dans la littérature. *, points de cassure identifiés dans ce projet.

Nos recherches ont révélé la présence de sites *in vitro* de clivage des TOP2 dans l'intron 2 de *USP42*. Toutefois, aucun site *in vitro* n'a été identifié dans les séquences de *RUNX1* (intron 7a ou 7b) ou de *TRPS1*. Or, l'intron 7a de *RUNX1* est reconnu comme une région riche en sites de clivage pour l'enzyme TOP2. En effet, des vingt-deux sites consensus prédits dans l'ensemble du gène *RUNX1*, sept sites de clivage dits sites *in vivo* sont répertoriés dans l'intron 7a (Zhang et al., 2002; Zhang and Rowley 2006). Ces sites *in vivo* colocalisent avec les cassures génomiques de certaines autres translocations

impliquant *RUNXI* rapportées par Zhang et Rowley incluant la t(5;21)(q13;q22), la t(12;21)(q24;q22) et la t(3;21)(q26;q22) (Fig. 8.2) et ont été incriminés dans la genèse de ces différents réarrangements (Roulston et al., 1998; Zhang and Rowley 2006). Vu la proximité du point de cassure de notre t(8;21)(q23.3;q22) dans l'intron 7a avec ceux des cas présentant les t(20;21)(q11;q22), t(3;21)(q26;q22), t(5;21)(q13;q22) et t(12;21)(q24;q22), les sites TOP2 *in vivo* de cet intron pourraient également être à l'origine de cette t(8;21)(q23.3;q22). Puisque la structure de la chromatine semble davantage diriger le clivage de l'ADN et que les sites *in vitro* ne reflètent pas nécessairement les cassures induites par les TOP2 dans une cellule vivante, nous croyons possible que les sites TOP2 puissent aussi être à l'origine de cette t(8;21)(q23.3;q22), expliquant la conservation d'une même microhomologie (5'-TTA/3'-AAT) de part et d'autre des jonctions *RUNXI-TRPS1/TRPS1-RUNXI*. En raison de l'administration d'idarubicine en induction, un rôle des inhibiteurs de la TOP2 n'est pas exclu dans la formation de cette translocation identifiée chez la patiente 10H006 avec t(8;21)(q23.3;q22). Ainsi, des essais de digestion enzymatique et des essais *in vivo* vérifiant la capacité de l'idarubicine à introduire des cassures au sein des séquences spécifiques de *RUNXI* et de *TRPS1* devront être réalisés avant d'imputer un rôle direct ou indirect à ces enzymes dans la genèse de la t(8;21)(q23.3;q22). Pour les mêmes raisons, les sites *in vitro* identifiés dans l'intron 2 de *USP42* devront également être confirmés par ces méthodes.

Les sites TOP2 sont largement incriminés dans la genèse des translocations chromosomiques des leucémies secondaires aux inhibiteurs TOP2 et ceci est particulièrement documenté pour les t(9;11)(p22;q23)/LAM et t(4;11)(q21;q23)/LAL impliquant *MLL* (Aplan 2006b; Felix et al., 2006) ainsi que pour la t(15;17)(q24;q21) des t-LPA (Mistry et al., 2005; Hasan et al., 2010). Des sites TOP2 *in vivo* ont été détectés à l'intérieur des points de cassure localisés dans l'intron 8 de *MLL* chez six patients documentés atteints d'une t-LAM avec t(4;11)(q21;q23) ou t(9;11)(p22;q23). Pour ces six cas, des jonctions précises ou quasi parfaites ont été observées résultant de petites délétions/duplications ou de l'ajout d'un très petit nombre de nucléotides « N » (Lovett et al., 2001; Langer et al., 2003; Whitmarsh et al., 2003). Tel que mentionné dans l'introduction, un échange entre deux complexes d'ADN/TOP2 suivi d'une recombinaison par le NHEJ produisant un minimum de remodelage des extrémités a été discuté comme un des mécanismes probables de formation pour ce type de jonction. Ces mêmes caractéristiques ont été observées lors de l'étude des jonctions génomiques des fusions *RUNX1-TRPS1/TRPS1-RUNX1*. Ces jonctions parfaites rappellent exactement le mécanisme décrit pour ces six cas présentant une t-LAM. Puisque les TOP2 introduisent des cassures à quatre bases d'intervalle sur des brins opposés permettant l'apparition de superpositions simple brins ayant quatre nucléotides libres et que les jonctions exprimées par les der(8) et der(21) présentent une microhomologie de trois et non pas de quatre nucléotides, l'hypothèse d'un simple échange a été écartée. En effet, une dégradation via une activité exonucléase et une polymérisation des nucléotides manquants sont nécessaires pour reconstituer chaque jonction suggérant l'implication

d'une polymérase possédant ces activités intrinsèques dans la genèse de cette t(8;21)(q23.3;q22). Un mécanisme impliquant à la fois les sites TOP2 et les composantes du NHEJ dans la genèse de cette translocation est donc proposé (Fig 8.3A).

Brièvement, des cassures simples brins pourraient être générées par les enzymes TOP2 au niveau des séquences de *RUNXI* et de *TRPS1* créant des superpositions de quatre nucléotides libres à l'extrémité 3' de chaque brin. La complémentarité des extrémités libres favoriserait l'appariement erroné des deux brins et permettraient une réparation générant un minimum de dégradation via le NHEJ. L'ADN polymérase de cette voie permettrait de combler les nucléotides manquants par polymérisation ou d'exciser les nucléotides supplémentaires, créant ainsi de parfaites jonctions (Fig. 8.3A). De façon intéressante, il a été rapporté que la présence de microhomologies en position terminale puisse dicter le recrutement de complexes protéiques de la recombinaison NHEJ (Daley et al., 2005). Plus l'homologie entre les deux brins est forte, plus les extrémités seront liguées rapidement sans l'intervention des autres composantes de la voie impliquées dans le remodelage des extrémités (Lieber 2010). L'existence d'une homologie de 83 % (10/12 nucléotides homologues) adjacente aux points de cassures des deux jonctions (TTTATATCATTA/intron 6 de *RUNXI* et TTTATATTCTTA/intron 2 de *TRPS1* ; Fig 5.4C) supporte ce mécanisme et appuie l'hypothèse d'un remodelage minimal par le NHEJ.

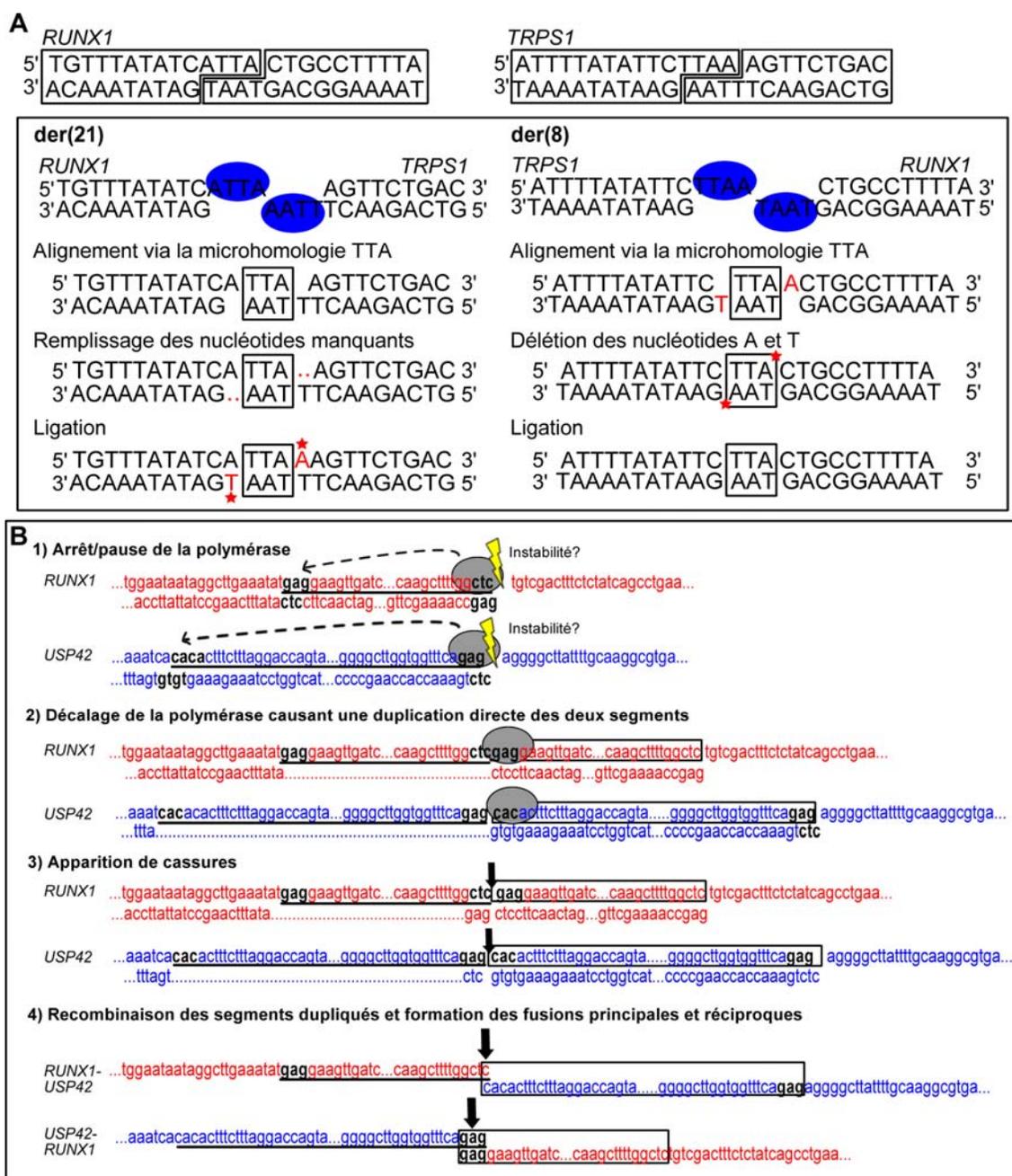


Figure 8.3. Mécanisme proposé à l'origine des jonctions *RUNX1-TRPS1/TRPS1-RUNX1* et *RUNX1-USP42/USP42-RUNX1*. (A) Les homodimères d'enzyme topoisomérase II (cercles bleus) introduisent des cassures simples brins dans l'ADN, à quatre bases d'intervalles et sur des brins opposés. Les bases communes (5'-TTA et 3'-AAT) des superpositions simples brins de *RUNX1* et de *TRPS1* sont ensuite alignées,

soumises à un remodelage des extrémités par remplissage des « gaps » ou par excision de nucléotides puis finalement liguées. Selon ce modèle, des jonctions parfaites sont produites. (B) Lors de la réplication, l'ADN polymérase (cercles gris) pourrait s'arrêter et subir un décalage au niveau des séquences originales de l'intron 7b de *RUNXI* (séquences soulignées et marquées en rouge) et de l'exon 2 de *USP42* (séquences soulignées et marquées en bleu), causant l'apparition d'une duplication en tandem dans ces séquences (séquences encadrées). Des cassures pourraient ensuite apparaître à l'extrémité des segments originaux (nucléotides en noir), favorisant ainsi une réparation des bris par le mécanisme de recombinaison NHEJ.

Un mécanisme de NHEJ est aussi proposé dans la genèse des jonctions *RUNXI-USP42/USP42-RUNXI* (Fig. 8.3B). Or, ces jonctions sont très différentes de celles décrites pour la $t(8;21)(q23.3;q22)$ démontrant plutôt un débalancement génomique traduit par l'ajout d'une séquence de 250 pb partagée par les deux fusions. Il est intéressant de noter, qu'en plus de montrer un point de cassure différent entre les deux fusions, une microhomologie de trois nucléotides (GAG) a été retrouvée au point de cassure de la fusion réciproque *USP42-RUNXI* alors qu'un seul nucléotide commun (C) a été détecté à la jonction de la fusion principale *RUNXI-USP42*, suggérant la nécessité d'un remodelage extensif des extrémités cassées. Les trois nucléotides de la microhomologie GAG ont aussi été détectés de part et d'autre de la région partagée de la fusion principale, encadrant les 250 nucléotides dupliqués. Le dédoublement de ces nucléotides, composés de l'ADN de l'intron 7 de *RUNXI* (84 pb) et de l'ADN de l'exon 2 et de l'intron 2 de *USP42* (166 pb), laisse supposer qu'il puisse d'abord y avoir eu duplication de ces deux segments indépendants puis possiblement insertion de ces

séquences dupliées au point de jonction de chacune des fusions (Fig. 8.3B). Deux hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer ces duplications. D'abord, un dérapage de la polymérase pourrait survenir lors du processus de réplication. Ce mécanisme possible survient davantage, mais non exclusivement au sein des régions d'ADN contenant plusieurs copies de petites séquences répétées directes ou inversées de deux à 49 pb. Le dérapage de la polymérase survient suite à une dissociation des brins impliqués dans la réplication et à un réalignement erroné causant l'apparition de duplications ou de délétions (Chen et al., 2005). Il est à noter qu'une petite répétition inversée de trois nucléotides encadre les 84 nucléotides dupliés de l'intron 7b de *RUNXI* (Fig. 8.3B). Or, ceci est moins clair pour *USP42*. Le mécanisme FoSTeS « Fork Stalling and Template Switching » lequel suggère que le brin retardé (aussi « lagging strand ») impliqué dans la réplication puisse se dissocier de la cible originale pour envahir une seconde fourche de réplication sur le chromosome homologue pourrait aussi être possible afin d'expliquer ces duplications (Lee et al., 2007; Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2009b). Puisque les signatures génomiques ne permettent pas d'élucider l'origine de ces segments dupliés, le mécanisme leur donnant naissance demeure incertain. Or, d'après la structure et la composition de ces jonctions, une série d'événements est nécessaire afin de recréer ce type de jonction plus complexe. Un modèle de recombinaison par le NHEJ, suivant un remodelage extensif de l'ADN, correspond cependant très bien aux caractéristiques présentées par ces jonctions.

Brièvement, le modèle proposé pour ces fusions *RUNXI-USP42* et *USP42-RUNXI* suppose qu'une instabilité soit présente au niveau des séquences de *RUNXI* et de *USP42* (bris simple brin induit par les TOP2, structure non-bêta de l'ADN, stabilisation d'un complexe intermédiaire TOP2/ADN par des inhibiteurs TOP2 environnementaux, courtes séquences répétées, etc.). Cette instabilité pourrait favoriser l'arrêt de la polymérase au niveau de ces deux segments, causant une dissociation des brins, un dérapage de la polymérase et un réalignement erroné. De courtes duplications directes en tandem pourraient ainsi voir le jour dans ces segments d'ADN. En raison de cette instabilité de nature encore incomprise, des DSB apparaîtraient ensuite aux mêmes endroits où la polymérase s'est initialement arrêtée, causant une cassure ainsi qu'une dissociation des segments dupliqués puis l'apparition d'extrémités libres présentant de faibles homologies. Nous croyons alors, que suite aux DSB, le mécanisme de recombinaison par le NHEJ pourrait être activé, favorisant la réparation de ces extrémités et l'émergence de cette translocation (Fig 8.3B). Ce type de jonction plus complexe, avec des microhomologies et de larges duplications, des insertions ou des délétions d'une base à plus d'un kb a été décrit dans certaines translocations des LAL et des LAM *de novo* [t(4;11)(q21;q23) et t(8;21)(q22;q22)], appuyant qu'une recombinaison erronée et un remodelage extensif puisse être à l'origine de ces translocations *de novo* (Xiao et al., 2001; Raffini et al., 2002; Zhang et al., 2002; Zhang and Rowley 2006).

8.3.1 Voie classique versus voie alternative du NHEJ

Malgré l'implication possible d'une même voie de réparation non-homologue, les jonctions identifiées sont hautement différentes laissant supposer une origine distincte et/ou l'action de différentes composantes/protéines dans leur élaboration. En fait, depuis quelques années, on admet l'existence d'une ramification du mécanisme de recombinaison NHEJ en voie classique/canonique (C-NHEJ) et en voie alternative (A-NHEJ) (Lieber 2010). Ces voies diffèrent en fonction de leur dépendance face aux microhomologies. En effet, la voie classique ne requiert aucune homologie terminale afin de réaliser la recombinaison de deux segments non-homologues alors que la voie alternative est dépendante des microhomologies présentes aux extrémités des bris, allant de 4 à 25 nucléotides, d'où son nom MMEJ « microhomology-mediated end joining » (Boboila et al., 2010b; Fattah et al., 2010; Lee-Theilen et al., 2010; Della-Maria et al., 2011). Un intérêt marqué pour cette dernière voie a vu le jour lorsqu'il a été démontré que la perte/délétion conditionnelle de certaines composantes essentielles de la voie C-NHEJ entraînait l'augmentation des translocations chromosomiques suggérant que la voie A-NHEJ puisse favoriser l'émergence des réarrangements chromosomiques (Roth and Wilson 1986; Boboila et al., 2010a; Lieber et al., 2010). La voie du A-NHEJ pourrait donc être un mécanisme à l'origine de la $t(8;21)(q23.3;q22)$ puisque d'importantes homologies de séquences ont été détectées aux jonctions de ces fusions. Cependant, puisque cette voie n'est, en théorie, favorisée que lorsque la voie classique est compromise ou déficiente, une origine découlant de la voie classique ne peut pas être exclue. Pour les jonctions non-balancées entre *RUNX1* et *USP42*, une seule hypothèse

permet de réconcilier le débalancement génomique et les faibles homologies détectées aux jonctions, c'est-à-dire la voie du C-NHEJ. En fait, puisque la A-NHEJ semble requérir des homologies de plus de 3 pb, la voie du C-NHEJ représente le mécanisme de recombinaison le plus probable pour cette $t(7;21)(p22;q22)$.

8.4 Étude des cibles des fusions **RUNX1**

Notre caractérisation moléculaire des translocations impliquant *RUNX1* nous a permis de révéler divers modes de dérégulation de ce facteur de transcription dans les leucémies aiguës. En effet, la création de protéines chimériques (fusions *RUNX1-USP42*, *RUNX1-TRPS1* et *RUNX1-PRDM16*), la production de protéines tronquées prédites de *RUNX1* (fusions *RUNX1-CLCA2* et *RUNX1-PRDM16*) et un dérèglement du dosage des différents transcrits de *RUNX1* (fusion *RUNX1-SV2B*) sont des conséquences de ces divers gènes de fusion (Fig. 8.4). Suite à ces études de caractérisation, deux questions ont été étudiées sur le plan expérimental :

- 1- Est-ce que les différents produits anormaux de *RUNX1* (isoforme tronquée versus chimère de fusion) produisent une signature transcriptionnelle similaire au niveau d'une même cible ?
- 2- Est-ce que les leucémies présentant une fusion plus rare de *RUNX1* ont un profil transcriptionnel similaire aux leucémies avec une fusion récurrente de *RUNX1* ?

Le matériel cellulaire humain étant limité, nous avons opté pour une évaluation sélective d'une série de gènes ayant déjà été rapportés comme des cibles de dérégulation de la fusion *RUNX1-RUNX1T1* ou *ETV6-RUNX1* afin d'étudier ces questions.

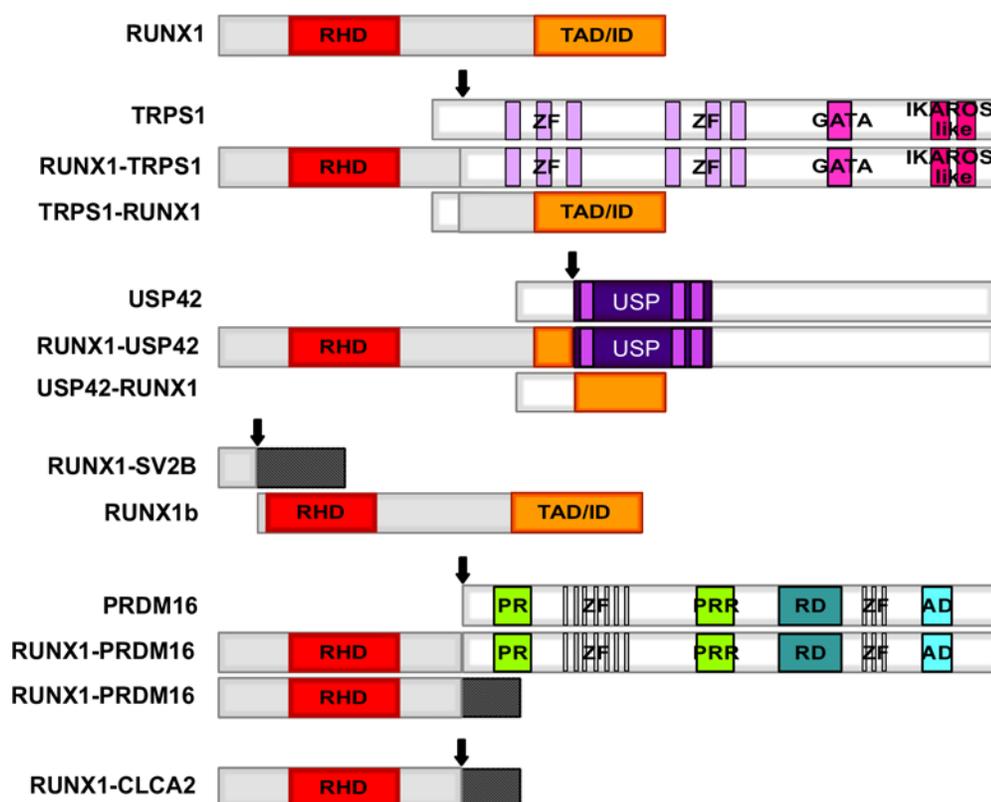


Figure 8.4. Schématisation de la protéine RUNX1 sauvage, des protéines de fusion et des protéines tronquées présumées engendrées lors des translocations ciblant *RUNX1*. Les protéines résultant des translocations $t(8;21)(q23.3;q22)/RUNX1-TRPS1$, $t(7;21)(p22;q22)/RUNX1-USP42$, $t(15;21)(q26.1;q22)/RUNX1$ tronqué, $t(1;21)(p36;q22)/RUNX1-PRDM16$ et $RUNX1$ tronqué et $t(1;21)(p22;q22)/RUNX1$ tronqué sont représentés. Une flèche indique le point de cassure sur le partenaire ou le point de fusion du partenaire avec *RUNX1*. Les produits tronqués de *RUNX1* sont représentés par un rectangle noir (*RUNX1-SV2B*, *RUNX1-PRDM16* et *RUNX1-CLCA2*). TAD/ID, domaine de régulation transcriptionnelle ; ZF, domaine en doigt de

zinc ; GATA, domaine en doigt de zinc de la famille GATA ; domaine en doigt de zinc de la famille Ikaros ; USP, domaine « ubiquitin specific peptidase » ; PR, domaine PR ; PRR, région riche en proline ; RD, domaine répresseur ; AD, domaine acide.

8.4.1 La voie Wnt dans les leucémies présentant un réarrangement de

RUNX1

Au cours des dernières années, l'étude des différentes fusions *MLL* a permis d'établir que ces chimères étaient capables d'induire une expression aberrante de certaines cibles préférentielles de *MLL* sauvage menant à la dérégulation de son réseau transcriptionnel, plus particulièrement à la dérégulation de l'expression des gènes *HOX* dans ces leucémies, et ce, malgré l'implication de partenaires variés de fusion (Kohlmann et al., 2005; Liedtke and Cleary 2009; Balgobind et al., 2011; Wang et al., 2011b). Plus récemment, il a été démontré que les fusions *MLL* des LAL du nourrisson et des LAM de l'enfant ont aussi une signature transcriptionnelle spécifique supposant qu'en plus des voies communes de dérégulation partagées par ces anomalies de *MLL* (exemple : *HOX*), une dérégulation plus spécifique, possiblement dépendante du partenaire ou des anomalies secondaires, est aussi observée (Stam et al., 2010; Pigazzi et al., 2011). Des profils similaires d'expression ont été démontrés par « gene expression profiling » pour les LAM avec anomalies du CBF [t(8;21)(q22;q22) et inv(16)(p13q22)] supportant l'existence de cibles communes dérégulées par ces deux entités génétiques (exemple : *CEBPA*) (Schoch et al., 2002; Bullinger and Valk 2005; Ichikawa et al., 2006; Bullinger et al., 2007). Or, dans ces études, la dérégulation d'une série de gènes plus spécifiques à

chaque anomalie est également observée, permettant la distinction des signatures géniques des LAM avec t(8;21)(q22;q22) (exemple : *POU4F1*) et des LAM avec inv(16)(p13q22) (exemple : *MNI*) (Ichikawa et al., 2006; Carella et al., 2007; Fortier et al., 2010).

Pour la plupart des chimères *RUNX1* étudiées à ce jour, une activité répressive a davantage été discutée et cette répression des fonctions de *RUNX1* sauvage a été incriminée afin d'expliquer le blocage de différenciation hématopoïétique caractéristique des LAM. La balance entre l'activation et la répression des cibles de *RUNX1* sauvage et des cibles des fusions *RUNX1* est dépendante de l'environnement protéique et du contexte cellulaire, mais les mécanismes guidant cette balance transcriptionnelle sont largement inconnus. La plupart des groupes étudiant la dérégulation transcriptionnelle associée à *RUNX1* n'ont analysé qu'une seule des fusions de *RUNX1*, soit *RUNX1-RUNX1T1* ou *ETV6-RUNX1*, permettant l'identification d'une grande variété de cibles spécifiques à ces fusions. Or, puisqu'aucune étude n'a évalué les différents réarrangements de *RUNX1* parallèlement, dans une même étude, le comportement clinique et moléculaire des fusions plus rares est demeuré inexploré. Ainsi, nos études d'expression (ARNm et protéine) nous ont permis d'identifier des composantes dérégulées et communes entre les anomalies récurrentes et plus rares du CBF, c'est-à-dire *CEBPA* et *JUP*, confirmant un certain regroupement de ces anomalies du CBF sur le plan transcriptionnel. Nos résultats démontrent que les gènes *CEBPA* et *JUP* ont une expression altérée, respectivement diminuée et activée, dans la plupart des échantillons

de leucémies primaires humaines étudiées présentant une anomalie de *RUNXI* ou de *CBFB* par rapport aux LAM avec caryotype normal. Nos analyses révèlent également que la surexpression de *CCND1* ou de *MYC* est plutôt spécifique à certains spécimens avec fusions *RUNXI* et absente dans les spécimens avec fusion *CBFB-MYH11*. Ce travail a permis de démontrer, pour la première fois, que la dérégulation de *JUP* est un évènement commun réunissant les différentes fusions plus rares et récurrentes de *RUNXI* ainsi que la fusion *CBFB-MYH11*. Un rôle central de *JUP* dans la pathogénèse de ces leucémies est donc possible et demeure à être confirmé sur le plan fonctionnel.

La réduction de *CEBPA* a précédemment été rapportée dans la plupart des spécimens avec anomalies récurrentes du *CBF* (Pabst et al., 2001; Cilloni et al., 2003). En effet, divers mécanismes affectant l'expression du gène ou de la protéine ont été répertoriés dans les LAM avec anomalies du *CBFB* et/ou de *RUNXI*, dans les LAM à caryotype normal, dans les LPA et dans les LMC-PB (hyperméthylation, mutation, répression de l'ARNm, blocage de la traduction). L'arrêt de différenciation noté dans ces maladies a été expliqué, en partie, par ces multiples altérations de *CEBPA*. Il n'est donc pas surprenant d'observer dans notre étude, une réduction de l'ARNm de *CEBPA* dans les spécimens avec anomalies plus rares de *RUNXI*, tel que rapporté dans les spécimens de LAM présentant les fusions *RUNXI-RUNXIT1* et *CBFB-MYH11*. Pour ces fusions présentant une réduction de *CEBPA* (toutes sauf *RUNXI-USP42*), les fonctions répressives des partenaires et/ou l'activité dominante négative des chimères pourraient être incriminées. En effet, les répresseurs PRDM16 et TRPS1 ainsi que les protéines

tronquées anormales résultant de la fusion *RUNX1-CLCA2* et possiblement de la fusion *RUNX1-SV2B* pourraient partager un pouvoir répressif au niveau du promoteur de *CEBPA*. Il est possible de postuler que les chimères de fusion et les protéines anormales exprimant certains motifs de *RUNX1* puissent altérer l'environnement protéique au promoteur de *CEBPA* perturbant ainsi son expression. Pour la fusion *RUNX1-SV2B*, nous avons aussi confirmé la réduction d'expression du transcrite *RUNX1c* ayant une activité prédite similaire à *RUNX1b* quant à l'activation transcriptionnelle. Ainsi, une réduction de cette isoforme pourrait expliquer la diminution d'expression de *CEBPA* observée dans ce cas. Des études protéiques devront être réalisées afin d'évaluer cette hypothèse. L'étude ciblée de l'expression de *CEBPA* entre les différentes fusions de *RUNX1* nous a alors permis de répondre à notre première question et de proposer que les isoformes tronquées/protéines anormales et les chimères de fusion générées par les différentes fusions récurrentes ou plus rares de *RUNX1* étudiées sont capables de réduire l'expression de *CEBPA*, établissant ce gène comme une cible commune (directe ou indirecte) des fusions *CBFB-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, *RUNX1-TRPS1*, *RUNX1-PRDM16*, *RUNX1-CLCA2* et *RUNX1-SV2B*. Malgré une réduction d'expression de *CEBPA* bien acceptée dans les leucémies présentant un réarrangement du CBF, aucun mécanisme fonctionnel ne permet encore d'expliquer cette répression transcriptionnelle avec certitude.

De façon intéressante, il a récemment été démontré que le domaine NHR1 de *RUNX1T1* est important pour l'activité d'auto-renouvellement des cellules leucémiques avec fusion

RUNX1-RUNX1T1 et que p300/CBP est spécifiquement recruté par ce domaine dans la lignée Kasumi-1 aux cibles normalement activées par la fusion (gènes étudiés : *IDI*, *CDKN1A/P21* et *EGR1*) alors qu'il n'est pas recruté aux cibles normalement réprimées par cette fusion (cibles étudiées : *CEBPA* et *SPI1*) (Wang et al., 2011a). Le recrutement spécifique de p300/CBP par RUNX1-RUNX1T1 permet l'acétylation des résidus lysine localisés dans la portion N-terminale de RUNX1, favorisant ainsi le recrutement des composantes du complexe de pré-initiation transcriptionnelle au niveau des cibles activées par la fusion (Wang et al., 2011a). L'absence de l'acétyltransférase p300/CBP au niveau du promoteur de *CEBPA* suggère que l'environnement protéique diffère au niveau d'une cible activée et d'une cible réprimée, et ce, malgré la capacité de RUNX1T1 à lier p300 au niveau de chaque cible. Ainsi, l'hypothèse d'un recrutement aberrant de co-répresseurs dans l'environnement de *CEBPA* est plausible permettant d'expliquer la réduction d'expression de cette cible dans les cellules étudiées.

Le recrutement de p300/CBP représente un mécanisme intéressant pouvant aussi expliquer l'activation de *JUP* dans les cellules leucémiques étudiées lors de ce projet. La région importante d'interaction de p300/CBP avec RUNX1 se situe au niveau de ses acides aminés 178 et 294, correspondant aux exons 6 et 7 de *RUNX1* (Kitabayashi et al., 1998). Une forte activation transcriptionnelle de *JUP* a été détectée dans les leucémies présentant les fusions *RUNX1-USP42*, *RUNX1-TRPS1* et *RUNX1-SV2B* alors qu'une activation moins marquée a été observée dans les spécimens présentant les fusions *RUNX1-PRDM16* et *RUNX1-CLCA2*. Il est intéressant de noter que le gène de fusion

RUNX1-USP42 exprime conjointement les exons 6 et 7 de *RUNX1* suggérant que la portion protéique de *RUNX1* exprimée par la chimère puisse toujours interagir avec p300/CBP. Les exons 6 et 7 sont aussi possiblement exprimés au sein de transcrits anormaux codés par l'allèle réarrangé suite à la t(15;21)(q26;q22). Enfin, il a été démontré que p300/CBP active le potentiel transcriptionnel du facteur GATA1 via une interaction avec son domaine en doigt de zinc GATA en position C-terminale. La protéine p300/CBP active également l'activité de GATA2, GATA3 et GATA4 laissant supposer qu'une interaction avec ce co-activateur soit aussi possible via le domaine GATA des autres membres de cette famille (Blobel et al., 1998). Ce domaine GATA, également exprimé par la chimère *RUNX1-TRPS1*, pourrait donc aussi lier et interagir avec p300/CBP. Ainsi, le recrutement de p300/CBP au promoteur de *JUP* par les fusions *RUNX1-USP42*, *RUNX1-TRPS1* et *RUNX1-SV2B* est une hypothèse intéressante afin d'expliquer l'activation transcriptionnelle de *JUP* dans ces cellules leucémiques.

JUP est cependant plus faiblement exprimé dans les cellules présentant les fusions *RUNX1-CLCA2* et *RUNX1-PRDM16*. Les produits tronqués mimant l'isoforme *RUNX1a* vraisemblablement exprimés par la fusion *RUNX1-CLCA2* et les chimères/produits tronqués possiblement formés lors de la fusion *RUNX1-PRDM16* n'expriment que les régions encodées par les exons 1 à 5 et/ou 1 à 6 de *RUNX1* via l'allèle réarrangé rendant moins probable la liaison de p300/CBP. Contrairement aux transcrits générés lors des t(7;21)(p22;q22) et t(15;21)(q26;q22), les fusions *RUNX1-CLCA2* et *RUNX1-PRDM16* n'expriment pas les exons 6 et 7 conjointement. De plus, à

ce jour, aucune littérature ne supporte une interaction entre les membres de la famille PRDM et p300/CBP. Cependant, une interaction avec P/CAF « p300/CBP associated factor », une acétyltransférase appartenant à une classe différente de p300/CBP, a été rapportée (Yang 2004). P/CAF interagit aussi avec RUNX1 sauvage et cette interaction est dépendante du RHD de la protéine (Senyuk et al., 2003). Il est donc possible que le recrutement de différents co-régulateurs par les isoformes tronquées et/ou chimères résultant des fusions *RUNX1-CLCA2* et *RUNX1-PRDM16* puisse modifier l'environnement protéique au promoteur de *JUP* réduisant ainsi le pouvoir d'activation transcriptionnelle de ces fusions au niveau de cette cible.

Malgré la présence d'un site consensus de *RUNX1* décrit sur le promoteur de *JUP*, aucune interaction directe entre la fusion RUNX1-RUNX1T1 et ce promoteur n'a été détectée par ChIP (Muller-Tidow et al., 2004; Tonks et al., 2007). Cependant, ce promoteur est activé en présence de la fusion suggérant un mode d'activation indirect (Muller-Tidow et al., 2004). Bien qu'une hausse d'expression de *JUP* soit associée aux anomalies du CBF, la contribution de *JUP* au processus de transformation leucémique n'est pas encore bien comprise. Il a été démontré que la surexpression de *JUP* dans la lignée de souris 32D (progéniteurs myéloïdes murins) ou dans les progéniteurs murins $Sca1^+/Lin^-$ favorise la prolifération cellulaire par rapport à une population contrôle (Muller-Tidow et al., 2004; Zheng et al., 2004). De plus, suite à une culture de cellules surexprimant *JUP* pendant 15 jours et lors d'études de prolifération sur des milieux de méthylcellulose, un phénotype immature ($Sca1^+/Lin^-$ ou $Sca^+/c-kit^+$) peut s'observer plus

longtemps pour les cellules surexprimant *JUP* alors qu'une différenciation survient dans la population contrôle suggérant que *JUP* puisse jouer un rôle dans l'auto-renouvellement (Muller-Tidow et al., 2004; Zheng et al., 2004). Lorsque injectés dans des souris receveuses, les progéniteurs surexprimant *JUP* induisent une maladie fatale ressemblant à une leucémie aiguë (Muller-Tidow et al., 2004; Zheng et al., 2004). Enfin, il a été démontré que l'inhibition de la transcription dépendante du complexe TCF/LEF à l'aide d'une forme dominante négative de TCF (dnTCF4) engendre une diminution de la croissance de la lignée Kasumi-1, suggérant que *JUP* puisse devenir une cible thérapeutique intéressante dans les leucémies présentant des anomalies du gène *RUNX1*. De plus, l'inhibition de *JUP* par une stratégie d'ARN interférence dans des cellules murines $Sca1^{+}Lin^{-}$ exprimant la fusion *PML-RARA* ou *PLZF-RARA* cause une forte réduction de la capacité de formation de colonies de ces cellules plus primitives supportant que l'activation de *JUP* puisse être requise afin de permettre la transformation leucémique (passage de la cellule pré-leucémique vers une cellule leucémique) (Muller-Tidow et al., 2004; Zheng et al., 2004).

Puisque l'activation de *CTNNB1* semble jouer un rôle dans la progression des cellules pré-leucémiques en cellules à plein potentiel transformant pour les fusions *MLL-MLLT3/AF9* et *MLL-ENL*, il est intéressant de penser que son homologue *JUP* puisse posséder des fonctions similaires lors du processus de leucémogénèse associé aux fusions du CBF (Wang et al., 2010; Yeung et al., 2010). Cependant, avant d'attribuer une telle fonction à cette composante de la voie Wnt, d'autres analyses devront être

complétées. Une analyse à l'aide de la technique ChIP-seq permettrait d'abord de confirmer ou d'infirmer une interaction directe entre RUNX1 et le gène *JUP*. À l'aide de cette méthode, il serait possible de déterminer, avec un anticorps ciblant le RHD de RUNX1, s'il y a une interaction directe avec une région spécifique du gène *JUP* (promoteur, séquence UTR ou séquence intronique). En effet, il a été démontré récemment que seulement 33 % des sites de liaison de RUNX1 au niveau de ses cibles activées lors de la différenciation mégacaryocytaire représentaient des régions promotrices, suggérant que la majorité des autres interactions puissent plutôt impliquer des séquences codantes ou des éléments « enhancer » de ses cibles (Tijssen et al., 2011).

Malgré le pronostic favorable des leucémies avec t(8;21)(q22;q22) et inv(16)(p13q22), environ 50 % des patients rechuteront, suggérant la persistance de la CSL et/ou une résistance de certains clones leucémiques aux thérapies actuellement utilisées. Il est donc urgent d'améliorer le traitement de ces patients. À cet effet, il est intéressant de noter que des études ciblant *CTNNB1*, l'homologue de *JUP*, démontrent le rôle thérapeutique potentiel de l'inhibition de ce gène dans la leucémie. Des expériences ont été réalisées sur les lignées HL60 et/ou Kasumi-1 à l'aide de petites molécules inhibant l'interaction entre *CTNNB1* et LEF1 (CGP049090, PKF115-584 ou le pyrvinium) ou à l'aide d'une stratégie d'ARN interférence ciblant *CTNNB1*, démontrant une réduction de la prolifération (étude du cycle cellulaire par FACS), une augmentation de l'apoptose (étude des caspases 3 et 7, de la PARP et de la fragmentation de l'ADN) ainsi qu'une réduction de la prise de greffe des cellules traitées avec ces molécules dans des souris

NOD/SCID déficientes pour la β 2-microglobuline (Minke et al., 2009; Gandillet et al., 2011). Ces expériences suggèrent qu'une stratégie similaire ciblant *JUP* pourrait s'avérer intéressante dans des lignées leucémiques présentant une t(8;21)(q22;q22) ainsi que dans des spécimens de leucémies primaires avec anomalies de *RUNXI* surexprimant *JUP*.

Ainsi, l'étude de cibles spécifiques des fusions *RUNXI* nous a permis de conclure que les fusions plus rares et récurrentes de *RUNXI* peuvent déréguler de mêmes cibles suggérant une certaine similitude quant aux mécanismes de dérégulation transcriptionnelle employés par ces fusions. De plus, nos analyses ont permis de démontrer que pour une même cible, par exemple *JUP*, les diverses protéines anormales générées lors des translocations peuvent déréguler cette cible de façon identique, et ce, malgré la variété des partenaires impliqués. Or, pour une même fusion (ex : *RUNXI-RUNXITI*) certains spécimens présentent des profils d'expression différents suggérant que d'autres évènements génétiques puissent moduler l'expression de cibles telles que *CCND1* ou *MYC*. Afin de poursuivre l'identification et la caractérisation des anomalies génétiques dans les leucémies aiguës, le séquençage des exomes, du génome et/ou du transcriptome complet des cellules de LAM a été initié par plusieurs équipes. Ces études permettront d'identifier de nouvelles mutations, de nouveaux gènes de fusion et dérégulations de gènes. Elles ont déjà permis de décrire de nouvelles mutations dont certaines ont un impact pronostique dans la LAM (Mardis et al., 2009; Ley et al., 2010; Thol et al., 2011; Yan et al., 2011). Ces études permettront aussi d'établir une incidence

plus juste de certaines translocations difficiles à détecter en cytogénétique standard incluant les fusions *RUNX1* et de caractériser de façon plus globale le génome et le transcriptome de ces cellules leucémiques, permettant l'identification plus précise des événements secondaires caractérisant ce groupe très hétérogène de leucémies avec anomalies de *RUNX1*.

9. Conclusion

Grâce à nos travaux de caractérisation moléculaire des translocations $t(7;21)(p22;q22)$, $t(1;21)(p22;q22)$, $t(8;21)(q23.3;q22)$ et $t(15;21)(q26;1.q22)$, nous avons révélé l'existence de différents modes de dérégulation de *RUNX1* permettant soit la formation de chimères de fusion, soit la création de protéines anormales reproduisant possiblement les isoformes plus courtes de *RUNX1* et/ou soit l'émergence d'un dosage aberrant des différents transcrits de *RUNX1*. L'hétérogénéité des réarrangements ciblant le gène *RUNX1*, autant sur le plan de la présentation clinique qu'au niveau moléculaire, a été mise en évidence. Notre étude des mécanismes de genèse des deux fusions récurrentes de *RUNX1* découlant des $t(7;21)(p22;q22)$ et $t(8;21)(q23.3;q22)$ a révélé des jonctions génomiques différentes en terme de composition et de structure suggérant l'implication de mécanismes distincts à l'origine de ces réarrangements. Malgré une origine précise encore indéterminée, un rôle central du mode de recombinaison non-homologue de type NHEJ et des enzymes TOP2 est fort probable. Enfin, nos analyses d'expression ont révélé une réduction de l'expression de *CEBPA* ainsi qu'une surexpression commune de *JUP* dans la majorité des leucémies étudiées présentant une anomalie du *CBF*, établissant ces dérégulations comme des éléments partagés par les réarrangements récurrents et plus rares. Nos résultats révèlent aussi qu'une altération plus spécifique de *CCND1* et de *MYC* est observée pour certains spécimens et/ou pour certains types d'anomalies, démontrant la nécessité d'étudier en parallèle ces différentes fusions afin de mieux comprendre les mécanismes de leucémogénèse employés par chacune d'elle.

Dans une perspective thérapeutique, il sera important d'investiguer la composition des complexes protéiques de RUNX1 sauvage et des différents complexes des fusions de RUNX1 ainsi que le « transcriptome » complet des cellules leucémiques primaires présentant ces anomalies afin d'identifier les facteurs essentiels requis lors du processus de transformation leucémique. Des cibles thérapeutiques potentielles pourront alors être mises en évidence permettant ensuite de proposer des études fonctionnelles visant à améliorer la thérapeutique de ces leucémies.

10. Annexe A : tableaux supplémentaires

BCLQ	Dx	Caryotype
01H002	M3	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[17]/45,XY,t(15;17)(q22;q21)-13[3]
02H003	M0	46,XX,del(2)(q21),add(8)(p21)[17]/46,XX[11]
02H017	M0	46,XX,t(11;19)(q23;p13.3)[14]/46,XX,t(11;19)(q23;p13.3),add(11)(p15)[7]
02H009	M1	46,XX[21]
02H025	M1	46,XX,t(2;16)(p11.2;q24)[8]/46,XX,del(12)(p13),der(17)t(17;22)(q25;q11.2)[4]/46,XX[11]
02H026	NOS	46-47,XY,add(1)(p36)[3],add(4)(p16)[5],+8[16],add(21)(q22)[6][cp17]/46,XY[7]
02H032	M5	46,XX,t(11;17)(q23;q21)[22]
02H037	LMC-PB	47,XY,t(8;17)(q11;q23),t(9;22)(q34;q11.2),+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[21]
02H043	M1	46,XX,del(11)(p12)[22]
02H046	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[20]
02H052	LMC-PB	45,XY,t(2;12)(q31;p12),der(9)t(9;22)(q34;q11.2),[3]/47,XY,t(2;12)(q31;p12),t(9;22)(q34;q11.2),+der(22)t(9;22)[15]/46,XY[3]
02H053	M1	46,XY[20]
02H060	M1	45,XY,-21[3]/46,XY[22]
02H066	M1	46,XX[22]
03H016	M5	46,XY[20]
03H033	M1	46,XX[21]
03H041	M5	46,XX[22]
03H054	LMC-PB	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[1]/47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11.2)[18]
03H065	M2	46,XY,t(4;8;21)(p14;q22;q22)[21]
03H067	M5	46,XY,t(11;17)(q23;q25)[19]/46,XY[1]
03H070	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[21]
03H083	M2	46,XY,t(8;21)(q22;q22),inv(9)(p11q12)c[20]
03H090	M1	46,XX,del(1)(p36.1),der(7)t(1;7)(p36.1;p15),der(10)t(10;12)(q10;q10),-12[21]
03H094	M1	45,XY,-3,del(3)(q12),-4,der(5)t(3;5)(p12;q11.2),del(6)(q21q25),t(9;10)(p13;q26),add(11)(p15),der(12)?del(12)(q22),der(12)t(4;12)(q32;q22),-15,der(16)?add(16)(p11.2),-17,der(17)?add(17)(p11.2)?del(17)(q12q22),der(18)add(18)(p11.2)t(17;18)(q12;q23),+del(22)(q13),+mar1,+mar2[19]
03H097	LAM/SMD	46,XY[22]
03H109	M4Eo	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
03H112	M4Eo	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
03H116	M1	46,XX[21]
03H119	M1	46,XY[20]
04H001	M1	47,XY,+13[13]/49,XY,+9,+13,+13[7]/46,XY[1].
04H027	LMC-PB	Quantité de cellules insuffisantes
04H041	M5	46,XY,t(11;17)(q23;q25)[18]/46,XY[2]
04H048	M1	46,XY,del(9)(q22q33)[19]/46,XY[1]
04H054	M2	46,XY,add(1)(q44),der(2)?add(2)(p11.2),der(2)?add(2)(q21),add(3)(q13),add(5)(p15),t(6;9)(p23;q34),del(17)(q23),add(19)(q13.4),del(20)(q12),+mar1[cp21]
04H055	M1	46,XY,del(20)(q11.2)[19]/46,XY[1]
04H061	M4Eo	46,XX,inv(16)(p13q22)[20]
04H068	M2	46,XX[20]
04H079	LAM/SMD	46,XX,inv(3)(q1q26)[23]
04H096	M0	45,XY,-7[3]/46,XY[8]
04H103	M1	46,XY,t(4;12)(q11q12;p13)[21]
04H108	M1	46,XX[20]
04H111	M5	47-49,XY,+8,+8,-12,-21,+mar[cp35]
04H112	M1	46,XX[21]
04H115	M5	42-46,XY,-4,-5,-6,del(7)(q22),-10,-11,-13,-15,-17,?(17)(q10),add(18)(q11.2),-18,-20,-21,-22,+1-9mar,+min[cp17]
04H118	M5	47,XY,+8[1]/49,XY,+8,+8,+20[20]
04H120	M1	46,XY,del(5)(q22q33),t(7;21)(p22;q22)[20]
04H123	M3	46,XX,del(12)(p11.2),t(15;17)(q22;q21)[10]/46,idem,del(7)(q22q32)[8]/46,XX[2]
04H133	M1	46,XX[20]
04H135	M1	47,XY,+11[18]/48,XY,+11,+14[2]/46,XY[1]
04H139	M3	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[15]
04H140	M4	46,XX[20]
05H008	M1	46,XX,inv(9)(p11q12)c[20]
05H030	M1	46,XX[22]
05H034	M1	47,XY,del(5)(q?31),+mar[21]
05H039	M2	46,XX[20]
05H050	M4	46,XY[20]
05H057	M5	Absence de métaphase
05H111	M1	46,XY[21]
05H133	SMD	46,XY[21]
05H143	M5	46,XY[22]
05H163	M1	46,XY[22]
05H181	M5	46,XX[9]
05H186	M4	46,XY[22]
05H195	M1	46,XX[20]
06H006	LMC-PB	46,XY,t(7;17)(p15,q2?2),t(9;22)(q34.1;q11.2)[9]/47,idem,+der(22),t(9;22)(q34.1;q11.2)[14]
06H010	M5	46,XX[21]
06H016	M5	45,XX,t(3;17)(p21;q11),add(12)(p11),-16[13]/46,idem,+mar[8]
06H026	M2	47,XX,+21[10]/46,XX[11]
06H028	M1	46,XX[20]
06H038	M4	46,XY,t(6;9)(p23;q34)[20]/46,XY[1]
06H045	M2	46,XX[22]
MC3	LMC-PB	-
KU-812	LMC-PB	-
MEG-01	LMC-PB	-
K562	LMC-PB	-
CD34	normal	-
Sp1	normal	-
Sp2	normal	-
Sp3	normal	-
05H028	normal	-
05H159	normal	-

Table 9.1. Spécimens utilisés pour l'étude d'expression du gène *USP42*. Se référer à la section 3.6.2 pour les résultats. Dx, diagnostic morphologique ; M0, leucémie myéloïde aiguë (LAM) avec différenciation minimale ; M1, LAM sans maturation ; M2, LAM avec maturation ; M3, leucémie promyélocytaire aiguë ; V, variante de la M3 ; M4, leucémie myélomonocytaire aiguë ; Eo, avec éosinophiles anormaux dans la moelle ; M5, leucémie monoblastique/monocytaire aiguë ; SMD, syndrome myélodysplasique ; LAM/SMD, LAM avec dysplasie significative ; LMC-PB, leucémie myéloïde chronique en phase blastique ; NOS, LAM non classée.

BCLQ	Dx	Caryotype
03H030	M0	44~48,XX,add(1)(p3?2),del(5)(q13),del(6)(p23),+8,add(18)(p11.3),+21[cp22]
04H025	M1	46,XY[21]
04H120	M1	46,XY,del(5)(q),t(7;21)(p21;q22.12)[20]
06H029	M1	46-48,X,del(X)(p22.1),del(2)(p21),add(4)(p11),+7,+der(7)add(7)(p222),-8,del(9)(p13),del(12)(p11.2),-14,-15,add(22)(p13),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,inc[cp19]/46,XX[1]
07H060	M1	45,X,-Y[20]
07H062	M1	46,XY[20]
04H141	M2	46,XY[20]
05H155	M2	46,XX[21]
05H180	M2	49,XY,t(4;13)(q31;q32),add(6)(q21),del(7)(q32),+8,+del(8)(q21q21),-20,-20,-21,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4[21]
06H021	M2	46,XX[21]
06H051	M2	46,XX[20]
06H075	M2	40~45,X,-Y,add(1)(p13),add(4)(q31),-5,-7,del(10)(q24),-12,ins(13;?)(q12;?),-14,-16,-17,-18,-19,+?21,-22,+7mar[cp16]/41,idem,add(2)(p11.2),t(3;8)(q21;q22),del(6)(q21),+mar8[cp3]/46,XY[1]
06H078	M2	46,XY[21]
07H010	M2	46,XX[20]
07H042	M2	46,XY[20]
04H094	M4	46,XY[20]
06H048	M4	47,XX,+8[19]/46,XX[1]
06H112	M4	46,XY[21]
06H143	M4	46,XY,t(4;7)(q21;q3?6)[6]/45,X,-Y,t(4;7)(q21;q3?6)[14]
07H019	M4	47,XY,+8[20]/46,XY[1]
02H033	M5	47,XY,+8[17]/49,XY,+6,+8,+8[2]/46,XY[2]
06H073	M5	46,XY,del(1)(p13)[21]
03H052	M5	46,XY[20]
07H055	M5	46,XY[20]
07H034	M6	44,X,-Y,add(3)(p13),del(5)(q13q33),-7,+8,dic(12;17)(p11.2;p11.2),-17[18]/88,XX,-Y,-Y,add(3)(p13)x2,del(5)(q13q33)x2,-7,-7,+8,+8,dic(12;17)(p11.2;p11.2)x2,-17,-17[2]
05H022	NOS	46,XY[20]
06H004	NOS	42~46,XX,del(3)(q25),add(3)(p23),add(4)(p11),del(5)(q11.2q33),-6,del(6)(q13q23),del(7)(q22q34),-13,add(13)(p11),-16,-17,-17x2,-18,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,inc[cp19]/46,XX[1]
07H088	normal	-
07H139	normal	-
07H140	normal	-
Kasumi	M2	-

Table 9.2. Spécimens utilisés lors du projet de validation de la surexpression de *USP42*. Se référer à la section 3.6.2 pour les résultats. Dx, diagnostic morphologique ; M0, leucémie myéloïde aiguë (LAM) avec différenciation minimale ; M1, LAM sans maturation ; M2, LAM avec maturation ; M4, leucémie myéloromonocytaire aiguë ; Eo, avec éosinophiles anormaux dans la moelle ; M5, leucémie monoblastique/monocytaire aiguë ; M6, leucémie érythroïde aiguë ; NOS, LAM non classée.

BCLQ	Dx	% blastes	Tissu	Caryotype
09H002	M1	94	moelle	46,XX[23]
09H013	M4	60	moelle	46,XY[22]
09H043	M1	80	moelle	46,XY[21]
04H120	M1	90	moelle	46,XY,del(5)(q22q33),t(7;21)(p22;q22)[20]
09H007	normal	-	moelle	-
07H139	normal	-	moelle	-
07H088	normal	-	moelle	-

Table 9.3. Spécimens de leucémies primaires utilisés lors de l'étude d'expression des allèles sauvages et transloqués de *USP42*. Se référer à la section 3.6.3 pour les résultats. Dx, diagnostic morphologique ; % de blastes, pourcentages de blastes évalué lors de l'analyse morphologique précédant la séparation par le Ficoll ; M1, leucémie myéloïde aiguë sans maturation ; M4, leucémie myéloromonocytaire aiguë.

BCLQ	Dx	% blastes	Tissu	Caryotype
02H003	M0	99	moelle	46,XX,del(2)(q31),add(8)(p21)[17]/46,XX[1]
03H030	M0	60	sang	44-48,XX,add(1)(p3?2),del(5)(q13),del(6)(p23),+8,add(18)(p11.3),+21[cp22]
05H192	M0	84	moelle	46,XY[18]
02H025	M1	70	sang	46,XX,t(2;16)(p11.2;q24)[8]/46,XX,del(12)(p13),der(17)t(17;22)(q25;q11.2)[4]/46,XX[11]
03H024	M1	10	moelle	47,XY,+8[18]/48,XY,+8,+8[3]/46,XY[1]
03H081	M1	50	moelle	47,XX,+8[21]
03H090	M1	90	sang	46,XX,del(1)(p36.1),der(7)t(1;7)(p36.1;p15),der(10)t(10;12)(q10;q10),-12[21]
03H119	M1	92	moelle	46,XY[20]
04H001	M1	85	sang	47,XY,+13[13]/49,XY,+9,+13,+13[7]/46,XY[1]
04H024	M1	76	moelle	46,XX[21]
04H025	M1	69	moelle	46,XY[21]
04H048	M1	60	sang	46,XY,del(9)(q22q33)[19]/46,XY[1]
04H055	M1	95	sang	46,XY,del(20)(q11.2)[19]/46,XY[1]
04H103	M1	80	sang	46,XY,t(4;12)(q11-q12;p13)[21]
04H108	M1	94	moelle	46,XX[20]
04H112	M1	91	moelle	46,XX[21]
04H127	M1	90	moelle	42-50,XX,-3,del(5)(q13q33),del(7)(q22),-8,add(10)(p11.2),-10,-11,del(11)(q23),add(12)(p11.2),+?13,-16,-17,-20,-21,-22,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,+mar7,+mar8,+mar9,+mar10[cp19]
04H135	M1	91	sang	47,XY,+1[18]/48,XY,+11,+14[2]/46,XY[1]
05H008	M1	96	moelle	46,XX,inv(9)(p11q12)c[20]
05H034	M1	80	sang	47,XY,del(5)(q?31),+mar[21]
05H111	M1	83	moelle	46,XY[21]
05H160	M1	87	moelle	46,XY[22]
05H195	M1	95	sang	46,XX[20]
04H006	M2	80	moelle	46,XY[20]
04H054	M2	-	moelle	46,XY,add(1)(q44),der(2)?add(2)(p11.2),der(2)?add(2)(q21),add(3)(q13),add(5)(p15),t(6;9)(p23;q34),del(17)(q23),add(19)(q13.4),del(20)(q12),+mar1[cp21]
04H096	M2	92	moelle	45,XY,-7[3]/46,XY[18]
04H141	M2	60	moelle	46,XY[20]
05H033	M2	30	moelle	46,XY[22]
05H039	M2	88	moelle	46,XX[20]
09H058	M2	74	sang	46,XX[20]
03H049	M4	-	moelle	46,XX[20]
05H050	M4	94	moelle	46,XY[20]
05H186	M4	85	moelle	46,XY[22]
03H031	M5	75	sang	Quantité insuffisante de métaphase
03H052	M5	62	moelle	46,XY[20]
04H111	M5	80	sang	47-49,XY,+8,+8,-12,-21,+mar[cp35]
04H115	M5	86	moelle	42-46,XY,-4,-5,-6,del(7)(q22),-10,-11,-13,-15,-17,?(17)(q10),add(18)(q11.2),-18,-20,-21,-22,+1-9mar,+min[cp17]
04H118	M5	81	moelle	47,XY,+8[1]/49,XY,+8,+8,+20[20]
05H057	M5	92	sang	Absence de métaphase
05H143	M5	85	sang	46,XY[22]
05H181	M5	80	sang	46,XX[9]
06H010	M5	84	moelle	46,XX[21]
01H005	LMMC	10	moelle	46,XY[20]
02H069	LMMC	10	moelle	46,XY[9]
03H084	LMMC	10	moelle	46,XY[20]
05H120	LMMC	4	sang	46,XX[22]
06H002	LMMC	8	moelle	46,XX[21]
09H049	LMMC	4	moelle	46,XX[22]
05H022	NOS	78	moelle	46,XY[20]
09H054	LA DM	63	sang	46-49,XX,add(5)(q3?5),-6,+8,+9,der(11)t(11;12)(q21;q?15),-12,-14,-16,-18,-20,-21,+1-8mar,+2min[cp22]

Table 9.4. Spécimens utilisés pour l'étude d'expression des USP (phase 1). Se référer à la section 3.6.2 pour les résultats. Dx, diagnostic morphologique ; % de blastes, pourcentages de blastes évalué lors de l'analyse morphologique précédant la séparation par le Ficoll ; M0, leucémie myéloïde aiguë (LAM) avec différenciation minimale ; M1, LAM sans maturation ; M2, LAM avec maturation ; M4, leucémie myélomonocytaire aiguë ; M5,

leucémie monoblastique/monocytaire aiguë ; LMMC, leucémie myélomonocytaire chronique ; DM, LAM avec dysplasie multilignée ; NOS, LAM non classée.

BCLQ	Dx	% blastes	Tissu	Caryotype
07H061	M0	85	sang	46-48,X,add(X)(p11),-3,-5,add(6)(p21),add(9)(p13),del(12)(p11),-17,+6,mar[cp19]/46,XX[1]
08H118	M0	67	sang	42-45,X,-X,-3,del(5)(q15q33),del(7)(q22q32),-14,add(16)(q?13),-17,-17,-20,-22,+1-5mar[cp20]
06H028	M1	95	moelle	46,XX[20]
06H029	M1	85	moelle	46-48,X,del(X)(p22.1),del(2)(p21),add(4)(p11),+7,+der(7)add(7)(p22),-8,del(9)(p13),del(12)(p11.2),-14,-15,add(22)(p13),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,inc[cp19]/46,XX[1]
06H077	M1	20	moelle	47,XX,+8[21]/46,XX[1]
07H062	M1	94	moelle	46,XY[20]
07H133	M1	82	sang	46,XX,t(13;6;17)(q14;p21;q21)[18]/46,XX[4]
07H143	M1	-	sang	Absence de métaphase
07H151	M1	90	moelle	47,XY,+13[2]/46,XY[20]
07H160	M1	85	moelle	45,XX,-7[19]/46,XX[1]
08H012	M1	98	sang	47,XX,+11[21]
08H036	M1	84	moelle	Absence de métaphase
08H053	M1	95	sang	46,XX[21]
08H056	M1	95	moelle	46,XX,?(10;21)(p11.2;q22)[5]/46,XX[18]
08H065	M1	90	moelle	46,XY,add(7)(q36)[6]/46,XY[14]
08H082	M1	89	moelle	46,XX[21]
08H113	M1	85	moelle	46,XY[23]
09H002	M1	78	sang	46,XX[23]
09H026	M1	95	sang	46,XY[20]
09H031	M1	85	sang	46,XX[20]
09H043	M1	80	moelle	46,XY[21]
06H026	M2	66	moelle	47,XX,+21[11]/46,XX[10]
06H045	M2	70	moelle	46,XX[22]
07H156	M2	44	moelle	42-48,XY,der(5)t(5;17)(q3?1;q12),+6,der(11)t(?;11)(?;q10),+13,-17,-20,+22,+mar,+min[cp20]
06H040	M4	72	moelle	45,X,-Y[19]/46,XY[2]
06H135	M4	90	sang	35-42,XY,-5,-8,-9,add(10)(p11),add(11)(q22),-13,?der(13)add(13)(q34),-14,add(15)(p11),-16,-17,-17,-18,+19,-20,-21,+r,+mar1,+mar2,+mar3,+r[cp10]/77-83,-X,-Y,-5,-5,-8,-8,-9,-9,?der(9)add(9)(q34),?der(9)add(9)(q34)x2,add(10)(p11),add(10)(p11)x2,-11,add(11)(q22)x2,-13,-13,-14,-14,add(15)(p11)x2,-16,-16,-17,-17,-20,-20,-21,-21,+mar1x2,+mar2x2,+mar3x2,inc[cp13]
08H138	M4	82	moelle	46,XY[20]
09H013	M4	60	moelle	46,XY[22]
06H016	M5	87	sang	45,XX,t(3;17)(p21;q11),add(12)(p11),-16[13]/46,idem,+mar[8]
06H061	M5	81	moelle	46,XX[20]
06H073	M5	89	moelle	46,XY,del(1)(p13)[21]
08H004	M5	87	sang	46,XX[5]
08H011	M5	47	moelle	47,XY,+8[8]/46,XY[2]
08H049	M5	80	moelle	46,XY[18]
08H063	M5	69	moelle	47,XY,+8[7]/46,XY[5]
08H089	M5	60	moelle	46,XY[22]
08H108	M5	60	moelle	47,XY,+8[2]/48,XY,+8,+8[17]/46,XY[1]
09H008	M5	58	sang	46,XY[20]
09H024	M5	81	sang	48,XY,+8,+8,add(21)(p12),inc[4]
06H084	LMMC	2	moelle	45,-X,Y,del(3)(p21),-5,-9,-13,-15,-17,-17,-22,+6mar[20]
07H145	LMMC	6	sang	47,XY,+21[17]/46,XY[4]
08H070	LMMC	5	sang	46,XY[22]
08H100	LMMC	12	moelle	46,XY[11]
07H005	LAM avec changements reliés à un SMD	90	moelle	46,XX[22]
08H112	LAM avec changements reliés à un SMD	55	sang	46,XY[20]
07H098	LA DM	64	sang	46,XY,del(9)(q13q22),t(10;11)(q24;p15)[21]
07H069	LAM NK	85	sang	46,XY,inv(7)(q22q36)[20]
07H122	MPAL	96	sang	Quantité insuffisante de métaphase
07H088	normal	-	moelle	-
07H139	normal	-	moelle	-
07H140	normal	-	moelle	-
09H007	normal	-	moelle	-

Table 9.5. Spécimens utilisés lors de la phase 2 du projet étudiant l'expression des USP. Se référer à la section 3.6.2 pour les résultats. Les quatre spécimens de moelle normale ont servi en phase 1 ainsi qu'en phase 2. Dx, diagnostic morphologique ; M0, leucémie myéloïde aiguë (LAM) avec différenciation minimale ; M1, LAM sans maturation ; M2, LAM avec maturation ; M4, leucémie myélomonocytaire aiguë ; M5, leucémie monoblastique/monocytaire aiguë ; LMMC, leucémie myélomonocytaire chronique ; DM, LAM avec dysplasie multilignée ; NK, LAM avec cellules « natural killer » ; MPAL, leucémie aiguë à phénotype mixte

BCLQ	Dx	Tissu	% Blastés	Caryotype
03H065	M2	moelle	63	46,XY,t(4;8;21)(p14;q22;q22)[21]
03H083	M2	sang	85	46,XY,t(8;21)(q22;q22),inv(9)(p11q12)c[20]
05H042	M2	sang	65	47,XY,t(8;21)(q22;q22),+8[21]
05H184	M1	sang	90	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[20]
07H137	M1	sang	90	45,X,-X,der(21)t(8;21)(q22;q22)?ins(21)(q22q22)[21]
08H034	M1	sang	83	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[20]
08H042	M2	sang	65	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[21]
08H072	M2	moelle	37	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[21]
09H040	M1	sang	60	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q13)[19]/46,XY[2]
10H030	M2	moelle	53	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[20]
03H109	M4Eo	moelle	92	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
03H112	M4Eo	moelle	80	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
04H061	M4Eo	moelle	72	46,XX,inv(16)(p13q22)[20]
06H115	M2Eo	sang	58	46,XY,inv(16)(p13q22)[14]/47,XY,inv(16)(p13q22),+22[7]
06H151	M1Eo	sang	90	46,XX,inv(16)(p13q22)[19]/47,XX,inv(16)(p13q22),+22[2]
07H099	M1	sang	82	46,XX,inv(16)(p13q22)[20]
07H144	M4Eo	sang	74	46,XY,add(2)(q21),der(16)inv(16)(p13q22)?t(2;16)(q21;q22),der(18)?ins(18;?) (q11.2;?)[21]
08H081	M4Eo	moelle	53	46,XX,inv(16)(p13q22)[22]
09H016	M4Eo	moelle	67	46,XX,inv(16)(p13q22)[19]/46,XX[5]
10H008	M4Eo	sang	60	48,XY,+8,inv(16)(p13q22),+21[21]
04H108	M1	moelle	94	46,XX[20]
05H160	M1	moelle	87	46,XY[22]
08H053	M1	sang	95	46,XX[21]
09H002	M1	sang	78	46,XX[23]
09H031	M1	sang	85	46,XX[20]
09H043	M1	moelle	80	46,XY[21]
09H070	M1	moelle	80	46,XY[20]
09H079	M0	moelle	90	46,XY[20]
09H106	M5	moelle	68	46,XY[22]
09H111	M5	moelle	83	46,XX[21]
10H026	M5	moelle	85	46,XX[23]
10H039	M1	sang	65	46,XX[21]
10H052	NOS	sang	66	46,XX[17]
04H120	M1	moelle	90	46,XY,del(5)(q22q33),t(7;21)(p22;q22)[20]
01-0788	M2	moelle	31	46,XX,t(17;21)(q22;q22)[13]/47,XX,+8, t(17;21)(q22;q22)[4]/47,XX,t(17;21)(q22;q22)[4]/46,XX[1]
08H131	MPAL	sang	79	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2),?t(15;21)(q26.1;q22)[20]
02H056	LMC-PB	sang	68	46,XX,t(1;21)(p36;q22),t(9;22)(q34;q11.2)[20]
10H024	LAM rechute	sang	20	46,XX,del(7)(q22),t(8;21)(q23.3;q22)[19]/46,XX[1]
07-0893	t-LAM	moelle	52	46,XY,t(1;21)(p22.3;q22)[26]
REH	LAL-B	-	-	-
Kasumi-1	M2	-	-	-
07H088	normal	moelle	-	-
07H139	normal	moelle	-	-
07H140	normal	moelle	-	-

Table 9.6. Spécimens utilisés lors de l'étude d'expression des gènes cibles des fusions *RUNX1* (étude préliminaire). Dix spécimens de leucémie aiguë myéloïde (LAM) avec t(8;21)(q22;q22), dix spécimens avec inv(16)(p13q22), treize spécimens avec un caryotype normal, les lignées REH et Kasumi1, six spécimens avec des translocations plus rares de *RUNX1* et trois spécimens de moelle normale ont été étudiés. Se référer aux sections 7.1 et 7.3 pour les résultats. Dx, diagnostic morphologique ; M0, LAM avec différenciation

minimale ; M1, LAM sans maturation ; Eo, avec éosinophiles anormaux ; M2, LAM avec maturation ; M4, leucémie myélomonocytaire aiguë ; M5, leucémie monoblastique/monocytaire aiguë ; NOS, LAM non classée ; MPAL, leucémie aiguë à phénotype mixte ; LAL-B, leucémie aiguë lymphoblastique de la lignée B ; LMC-PB, leucémie myéloïde chronique en phase blastique ; t-LAM, LAM secondaire à une chimiothérapie antérieure.

BCLQ	Dx FAB	% blastes	Spécimen	Caryotype
04H006	M2	80	moelle	46,XY[20]
04H054	M2	-	moelle	46,XY,add(1)(q44),der(2)?add(2)(p11.2),der(2)?add(2)(q21),add(3)(q13),add(5)(p15),t(6;9)(p23;q34),del(17)(q23),add(19)(q13.4),del(20)(q12),+mar1[cp21]
04H096	M2	92	moelle	45,XY,-7[3]/46,XY[18]
04H141	M2	60	moelle	46,XY[20]
05H033	M2	30	moelle	46,XY[22]
05H039	M2	88	moelle	46,XX[20]
06H026	M2	66	moelle	47,XX,+21[11]/46,XX[10]
06H045	M2	70	moelle	46,XX[22]
07H156	M2	44	moelle	42~48,XY,der(5)t(5;17)(q3?1;q12),+6,der(11)t(?;11)(?;q10),+13,-17,-20,+22,+mar,+min[cp20]
07H062	M1	94	moelle	46,XY[20]
08H004	M5	87	sang	46,XX[5]
08H049	M5	80	moelle	46,XY[18]
08H053	M1	95	sang	46,XX[21]
09H002	M1	78	sang	46,XX[23]
09H031	M1	85	sang	46,XX[20]
09H043	M1	80	moelle	46,XY[21]
09H070	M1	80	moelle	46,XY[20]
09H106	M5	68	moelle	46,XY[22]
10H052	NOS	65	sang	46,XX[17]
03H083	M2	85	sang	46,XY,t(8;21)(q22;q22),inv(9)(p11q12)c[20]
05H042	M2	65	sang	47,XY,t(8;21)(q22;q22),+8[21]
05H184	M1	90	sang	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[20]
07H137	M1	90	sang	45,X,-X,der(21)t(8;21)(q22;q22)?ins(21)(q22q22)[21]
08H034	M1	83	sang	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[20]
08H042	M2	65	sang	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[21]
08H072	M2	37	moelle	46,XX,t(8;21)(q22;q22)[21]
09H040	M1	60	sang	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q13)[19]/46,XY[2]
10H030	M2	53	moelle	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[20]
10H119	M2	40	sang	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[20]
03H109	M4Eo	92	moelle	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
03H112	M4Eo	80	moelle	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
04H061	M4Eo	72	moelle	46,XX,inv(16)(p13q22)[20]
07H144	M4Eo	74	sang	46,XY,add(2)(q21),der(16)inv(16)(p13q22)?t(2;16)(q21;q22),der(18)?ins(18;?)(q11.2;?)[21]
08H081	M4Eo	53	moelle	46,XX,inv(16)(p13q22)[22]
09H016	M4Eo	67	moelle	46,XX,inv(16)(p13q22)[19]/46,XX[5]
10H008	M4Eo	60	sang	48,XY,+8,inv(16)(p13q22),+21[21]
04H120	M1	90	moelle	46,XY,del(5)(q22q33),t(7;21)(p22;q22)[20]
08H131	MPAL	79	sang	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2),t(15;21)(q26.1;q22)[20]
02H056	LMC-PB	68	sang	46,XX,t(1;21)(p36;q22),t(9;22)(q34;q11.2)[20]
10H024	LAM rechute	20	sang	46,XX,del(7)(q22),t(8;21)(q23.3;q22)[19]/46,XX[1]
07-0893	t-LAM	52	moelle	46,XY,t(1;21)(p22.3;q22)[26]
REH	LAL-B	-	-	-
Kasumi-1	M2	-	-	-
07H088	normal	-	moelle	-
07H140	normal	-	moelle	-
09H007	normal	-	moelle	-

Table 9.7. Spécimens utilisés lors de l'étude d'expression des gènes cibles des fusions *RUNX1* (étude de validation). Quatre spécimens de leucémie aiguë myéloïde (LAM) avec maturation sans t(8;21), quinze spécimens avec un caryotype normal, dix spécimens avec t(8;21)(q22;q22), sept spécimens avec inv(16)(p13q22), cinq spécimens avec des translocations plus rares de *RUNX1*, les lignées REH et Kasumi1 et trois spécimens de moelle normale ont été étudiés. Se référer à la section 7.1 et 7.3 pour les résultats. Dx, diagnostic morphologique ; M1, LAM sans maturation ; Eo, avec éosinophiles anormaux ; M2, LAM avec maturation ; M4, leucémie myélomonocytaire aiguë ; M5, leucémie monoblastique/monocytaire aiguë ; NOS, LAM non classée ; MPAL, leucémie aiguë à phénotype mixte ; LAL-B, leucémie aiguë lymphoblastique de la lignée B ; LMC-PB, leucémie myéloïde chronique en phase blastique ; t-LAM, LAM secondaire à une chimiothérapie antérieure.

BCLQ	Dx	% blastes	Tissu	Caryotype
08H113	M1	85	moelle	46,XY[23]
09H002	M1	94	moelle	46,XX[23]
09H026	M1	96	moelle	46,XY[20]
10H024	LAM rechute	20	sang	46,XX,del(7)(q22),t(8;21)(q23.3;q22)[19]/46,XX[1]
07H088	normal	-	moelle	-
07H140	normal	-	moelle	-
09H007	normal	-	moelle	-

Table 9.8. Spécimens utilisés lors de l'étude d'expression des allèles sauvages et transloqués de *TRPS1*. Dx, diagnostic morphologique ; M1, leucémie myéloïde aiguë (LAM) sans maturation. Se référer à la section 5.5 pour les résultats.

BCLQ	Dx	% blastes	Tissu	Caryotype
03H045	MPAL	87	moelle	45,XY,-7,t(9;22)(q34;q11.1)[13]/46,XY,-7,t(9;22)(q34;q11.1),+mar[4]/46,XY[3]
03H085	MPAL	84	moelle	45,XX,-7,t(9;22)(q34;q11.2)[16]/46,XX[5]
05H153	MPAL	90	moelle	45-49,XY,der(2;14)(q10;q10),+der(2;14)(p10;p10),add(5)(p13),add(6)(q21),-7,+8,t(9;22)(q34;q11.2),+9,+10,+?12,add(14)(q32),+add(14)(q32),add(20)(q12),-20,+mar1,inc[cp17]/46,XY[4]
08H131	MPAL	79	sang	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2),t(15;21)(q26.1;q22)[20]
REH	LAL-B	-	-	-
07H088	normal	-	moelle	-
07H140	normal	-	moelle	-
09H007	normal	-	moelle	-

Table 9.9. Spécimens utilisés lors de l'étude d'expression des gènes *RUNX1* et *SLCO3A1*. Se référer aux sections 6.5 et 6.7 pour les résultats. MPAL, leucémie aiguë à phénotype mixte ; LAL-B, leucémie aiguë lymphoblastique de la lignée B.

11. Annexe B : article 1

***CLCA2*, a novel *RUNXI* partner gene in a therapy-related leukemia with t(1;21)(p22;q22) translocation**

- **Manuscrit CGC-10-00089 soumis le 26 février 2010 au journal « Cancer Genetics and Cytogenetics »**
- **Première revision soumise le 28 mai 2010 et deuxième revision soumise le 16 juin 2010**
- **Accepté le 2 juillet 2010**

12. Annexe C : article 2

Microhomologies and topoisomerase II consensus sequences identified near the breakpoint junctions of the recurrent t(7;21)(p22;q22) translocation in acute myeloid leukemia

- **Manuscrit GCC-10-0213 soumis le 22 novembre 2010 au journal « Gene chromosomes and Cancer »**
- **Accepté le 30 novembre 2010**

Bibliographie

- Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU. 2001. The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. *J Biol Chem* 276(27):25438-25446.
- Adachi H, Suzuki T, Abe M, Asano N, Mizutamari H, Tanemoto M, Nishio T, Onogawa T, Toyohara T, Kasai S, Satoh F, Suzuki M, Tokui T, Unno M, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T. 2003. Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. *Am J Physiol Renal Physiol* 285(6):F1188-1197.
- Agarwal S, Tafel AA, Kanaar R. 2006. DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10):1075-1081.
- Agerstam H, Lilljebjorn H, Lassen C, Swedin A, Richter J, Vandenberghe P, Johansson B, Fioretos T. 2007. Fusion gene-mediated truncation of RUNX1 as a potential mechanism underlying disease progression in the 8p11 myeloproliferative syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 46(7):635-643.
- Ahuja HG, Felix CA, Aplan PD. 2000. Potential role for DNA topoisomerase II poisons in the generation of t(11;20)(p15;q11) translocations. *Genes Chromosomes Cancer* 29(2):96-105.
- Alcalay M, Meani N, Gelmetti V, Fantozzi A, Fagioli M, Orleth A, Riganelli D, Sebastiani C, Cappelli E, Casciari C, Scieurpi MT, Mariano AR, Minardi SP, Luzi L, Muller H, Di Fiore PP, Frosina G, Pelicci PG. 2003. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J Clin Invest* 112(11):1751-1761.
- Angelova S, Zechev J, Stoimenov A, Spassov B, Romanova M, Shivarov V. 2011. A novel t(7;21)(q32;q22) translocation disrupting the RUNX1 gene in an adult patient with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 52(12):2396-2398.
- Aplan PD. 2006a. Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends Genet* 22(1):46-55.
- Aplan PD. 2006b. Chromosomal translocations involving the MLL gene: molecular mechanisms. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10):1265-1272.
- Aplan PD, Chervinsky DS, Stanulla M, Burhans WC. 1996. Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* 87(7):2649-2658.
- Asou N. 2003. The role of a Runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 45(2):129-150.
- Asou N, Yanagida M, Huang L, Yamamoto M, Shigesada K, Mitsuya H, Ito Y, Osato M. 2007. Concurrent transcriptional deregulation of AML1/RUNX1 and GATA factors by the AML1-TRPS1 chimeric gene in t(8;21)(q24;q22) acute myeloid leukemia. *Blood* 109(9):4023-4027.

- Athanasidou A, Stalika E, Sidi V, Papaioannou M, Gaitatzi M, Anagnostopoulos A. 2010. RUNX1-MTG16 fusion gene in de novo acute myeloblastic leukemia with t(16;21)(q24;q22). *Leuk Lymphoma* 52(1):145-147.
- Azim HA, Jr., de Azambuja E, Colozza M, Bines J, Piccart MJ. 2011. Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 22(9):1939-1947.
- Back J, Allman D, Chan S, Kastner P. 2005. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp Hematol* 33(4):395-402.
- Bae SC, Lee YH. 2006. Phosphorylation, acetylation and ubiquitination: the molecular basis of RUNX regulation. *Gene* 366(1):58-66.
- Bajjalieh SM, Peterson K, Linial M, Scheller RH. 1993. Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(6):2150-2154.
- Balakrishnan A, von Neuhoff N, Rudolph C, Kamphues K, Schraders M, Groenen P, van Krieken JH, Callet-Bauchu E, Schlegelberger B, Steinemann D. 2006. Quantitative microsatellite analysis to delineate the commonly deleted region 1p22.3 in mantle cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 45(10):883-892.
- Balgobind BV, Zwaan CM, Pieters R, Van den Heuvel-Eibrink MM. 2011. The heterogeneity of pediatric MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Leukemia* 25(8):1239-1248.
- Barch MJ, Association of Cytogenetic Technologists. 1991. The AGT cytogenetics laboratory manual. 2nd ed. New York: Raven Press. xiii, 625 p.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, Slater R, Smit EM, Beverloo HB, Verhoef G, Verdonck LF, Ossenkuppele GJ, Sonneveld P, de Greef GE, Lowenberg B, Delwel R. 2003. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 101(3):837-845.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Janssen J, Maas LM, Godschalk RW, Nijhuis JG, van Schooten FJ. 2007. Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34+ cells. *Carcinogenesis* 28(8):1703-1709.
- Barseguian K, Lutterbach B, Hiebert SW, Nickerson J, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS. 2002. Multiple subnuclear targeting signals of the leukemia-related AML1/ETO and ETO repressor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15434-15439.
- Baum JA, Giles NH. 1986. DNase I hypersensitive sites within the inducible qa gene cluster of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(17):6533-6537.
- Belson M, Kingsley B, Holmes A. 2007. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect* 115(1):138-145.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33(4):451-458.
- Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, Iscove NN. 2010. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* 6(1):48-58.
- Beri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, Bonnet C, Chambon P, Roth V, Gregoire MJ, Bordigoni P, Lecompte T, Leheup B, Jonveaux P. 2008. Clinical

- phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet* 16(8):1014-1018.
- Bernardin F, Yang Y, Cleaves R, Zahurak M, Cheng L, Civin CI, Friedman AD. 2002. TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res* 62(14):3904-3908.
- Biswas D, Milne TA, Basrur V, Kim J, Elenitoba-Johnson KS, Allis CD, Roeder RG. 2011. Function of leukemogenic mixed lineage leukemia 1 (MLL) fusion proteins through distinct partner protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(38):15751-15756.
- Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, Orkin SH. 1998. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5):2061-2066.
- Boboila C, Jankovic M, Yan CT, Wang JH, Wesemann DR, Zhang T, Fazeli A, Feldman L, Nussenzweig A, Nussenzweig M, Alt FW. 2010a. Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(7):3034-3039.
- Boboila C, Yan C, Wesemann DR, Jankovic M, Wang JH, Manis J, Nussenzweig A, Nussenzweig M, Alt FW. 2010b. Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4. *J Exp Med* 207(2):417-427.
- Bohlander SK. 2005. ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol* 15(3):162-174.
- Bonnet D, Dick JE. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3(7):730-737.
- Bott L, Thumerelle C, Cuvellier JC, Deschildre A, Vallee L, Sardet A. 2006. [Ataxia-telangiectasia: a review]. *Arch Pediatr* 13(3):293-298.
- Broeker PL, Super HG, Thirman MJ, Pomykala H, Yonebayashi Y, Tanabe S, Zeleznik-Le N, Rowley JD. 1996. Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* 87(5):1912-1922.
- Bullinger L, Rucker FG, Kurz S, Du J, Scholl C, Sander S, Corbacioglu A, Lottaz C, Krauter J, Frohling S, Ganser A, Schlenk RF, Dohner K, Pollack JR, Dohner H. 2007. Gene-expression profiling identifies distinct subclasses of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 110(4):1291-1300.
- Bullinger L, Valk PJ. 2005. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 23(26):6296-6305.
- Burda P, Laslo P, Stopka T. 2010. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia* 24(7):1249-1257.
- Burmeister T, Gokbuget N, Schwartz S, Fischer L, Hubert D, Sindram A, Hoelzer D, Thiel E. 2010. Clinical features and prognostic implications of TCF3-PBX1 and ETV6-RUNX1 in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 95(2):241-246.
- Byrd JC, Dodge RK, Carroll A, Baer MR, Edwards C, Stamberg J, Qumsiyeh M, Moore JO, Mayer RJ, Davey F, Schiffer CA, Bloomfield CD. 1999. Patients with

- t(8;21)(q22;q22) and acute myeloid leukemia have superior failure-free and overall survival when repetitive cycles of high-dose cytarabine are administered. *J Clin Oncol* 17(12):3767-3775.
- Cai Z, de Bruijn M, Ma X, Dortland B, Luteijn T, Downing RJ, Dzierzak E. 2000. Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* 13(4):423-431.
- Cairolì R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB, Colapietro P, Nichelatti M, Pezzetti L, Lunghi M, Cuneo A, Viola A, Ferrara F, Lazzarino M, Rodeghiero F, Pizzolo G, Larizza L, Morra E. 2006. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* 107(9):3463-3468.
- Carella C, Bonten J, Sirma S, Kranenburg TA, Terranova S, Klein-Geltink R, Shurtleff S, Downing JR, Zwarthoff EC, Liu PP, Grosveld GC. 2007. MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML. *Leukemia* 21(8):1679-1690.
- Castilla LH, Wijmenga C, Wang Q, Stacy T, Speck NA, Eckhaus M, Marin-Padilla M, Collins FS, Wynshaw-Boris A, Liu PP. 1996. Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in leukemia gene CFBF-MYH11. *Cell* 87(4):687-696.
- Chakraborty S, Senyuk V, Sitailo S, Chi Y, Nucifora G. 2001. Interaction of EVI1 with cAMP-responsive element-binding protein-binding protein (CBP) and p300/CBP-associated factor (P/CAF) results in reversible acetylation of EVI1 and in colocalization in nuclear speckles. *J Biol Chem* 276(48):44936-44943.
- Challen GA, Goodell MA. 2010. Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 38(5):403-416.
- Chan EM, Comer EM, Brown FC, Richkind KE, Holmes ML, Chong BH, Shiffman R, Zhang DE, Slovak ML, Willman CL, Noguchi CT, Li Y, Heiber DJ, Kwan L, Chan RJ, Vance GH, Ramsey HC, Hromas RA. 2005. AML1-FOG2 fusion protein in myelodysplasia. *Blood* 105(11):4523-4526.
- Chang GT, Jhamai M, van Weerden WM, Jenster G, Brinkmann AO. 2004. The TRPS1 transcription factor: androgenic regulation in prostate cancer and high expression in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 11(4):815-822.
- Chang GT, Steenbeek M, Schippers E, Blok LJ, van Weerden WM, van Alewijk DC, Eussen BH, van Steenbrugge GJ, Brinkmann AO. 2000. Characterization of a zinc-finger protein and its association with apoptosis in prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 92(17):1414-1421.
- Chang GT, van den Bemd GJ, Jhamai M, Brinkmann AO. 2002. Structure and function of GC79/TRPS1, a novel androgen-repressible apoptosis gene. *Apoptosis* 7(1):13-21.
- Chen JM, Chuzhanova N, Stenson PD, Ferec C, Cooper DN. 2005. Meta-analysis of gross insertions causing human genetic disease: novel mutational mechanisms and the role of replication slippage. *Hum Mutat* 25(2):207-221.
- Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. 2009. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 457(7231):887-891.

- Chen W, Kumar AR, Hudson WA, Li Q, Wu B, Staggs RA, Lund EA, Sam TN, Kersey JH. 2008. Malignant transformation initiated by Mll-AF9: gene dosage and critical target cells. *Cancer Cell* 13(5):432-440.
- Cherry AM, Bangs CD, Jones P, Hall S, Natkunam Y. 2001. A unique AML1 (CBF2A) rearrangement, t(1;21)(p32;q22), observed in a patient with acute myelomonocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 129(2):155-160.
- Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M. 2008. Identification of the novel AML1 fusion partner gene, LAF4, a fusion partner of MLL, in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(2;21)(q11;q22) by bubble PCR method for cDNA. *Oncogene* 27(15):2249-2256.
- Choi Y, Elagib KE, Delehanty LL, Goldfarb AN. 2006. Erythroid inhibition by the leukemic fusion AML1-ETO is associated with impaired acetylation of the major erythroid transcription factor GATA-1. *Cancer Res* 66(6):2990-2996.
- Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. 2004. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood* 104(5):1474-1481.
- Ciau-Uitz A, Pinheiro P, Gupta R, Enver T, Patient R. 2010. Tel1/ETV6 specifies blood stem cells through the agency of VEGF signaling. *Dev Cell* 18(4):569-578.
- Cilloni D, Carturan S, Gottardi E, Messa F, Messa E, Fava M, Diverio D, Guerrasio A, Lo-Coco F, Saglio G. 2003. Down-modulation of the C/EBPalpha transcription factor in core binding factor acute myeloid leukemias. *Blood* 102(7):2705-2706.
- Cozzio A, Passegue E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL. 2003. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* 17(24):3029-3035.
- Cuenco GM, Nucifora G, Ren R. 2000. Human AML1/MDS1/EVI1 fusion protein induces an acute myelogenous leukemia (AML) in mice: a model for human AML. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4):1760-1765.
- Cuenco GM, Ren R. 2001. Cooperation of BCR-ABL and AML1/MDS1/EVI1 in blocking myeloid differentiation and rapid induction of an acute myelogenous leukemia. *Oncogene* 20(57):8236-8248.
- Cuenco GM, Ren R. 2004. Both AML1 and EVI1 oncogenic components are required for the cooperation of AML1/MDS1/EVI1 with BCR/ABL in the induction of acute myelogenous leukemia in mice. *Oncogene* 23(2):569-579.
- D'Alo F, Di Ruscio A, Guidi F, Fabiani E, Greco M, Rumi C, Hohaus S, Voso MT, Leone G. 2008. PU.1 and CEBPA expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 32(9):1448-1453.
- Dai H, Xue Y, Pan J, Wu Y, Wang Y, Shen J, Zhang J. 2007. Two novel translocations disrupt the RUNX1 gene in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 177(2):120-124.
- Dai HP, Xue YQ, Zhou JW, Li AP, Wu YF, Pan JL, Wang Y, Zhang J. 2009. LPXN, a member of the paxillin superfamily, is fused to RUNX1 in an acute myeloid

- leukemia patient with a t(11;21)(q12;q22) translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 48(12):1027-1036.
- Daley JM, Laan RL, Suresh A, Wilson TE. 2005. DNA joint dependence of pol X family polymerase action in nonhomologous end joining. *J Biol Chem* 280(32):29030-29037.
- Davis JN, McGhee L, Meyers S. 2003. The ETO (MTG8) gene family. *Gene* 303:1-10.
- De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Ferec C, De Braekeleer M. 2011. RUNX1 translocations and fusion genes in malignant hemopathies. *Future Oncol* 7(1):77-91.
- Della-Maria J, Zhou Y, Tsai MS, Kuhnlein J, Carney J, Paull T, Tomkinson A. 2011. hMre11/hRad50/Nbs1 and DNA ligase III α /XRCC1 act together in an alternative non-homologous end joining pathway. *J Biol Chem* 286(39):33845-33845.
- Deschler B, Lubbert M. 2006. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 107(9):2099-2107.
- Dicker F, Haferlach C, Sundermann J, Wendland N, Weiss T, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. 2010. Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia* 24(8):1528-1532.
- Dorsett Y, Robbiani DF, Jankovic M, Reina-San-Martin B, Eisenreich TR, Nussenzweig MC. 2007. A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J Exp Med* 204(9):2225-2232.
- Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. 2012. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* 10(2):120-136.
- Draker R, Sarcinella E, Cheung P. 2011. USP10 deubiquitylates the histone variant H2A.Z and both are required for androgen receptor-mediated gene activation. *Nucleic Acids Res* 39(9):3529-3542.
- Dzierzak E, Speck NA. 2008. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 9(2):129-136.
- Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. 2003. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* 101(11):4333-4341.
- Elble RC, Pauli BU. 2001. Tumor suppression by a proapoptotic calcium-activated chloride channel in mammary epithelium. *J Biol Chem* 276(44):40510-40517.
- Elble RC, Walia V, Cheng HC, Connon CJ, Mundhenk L, Gruber AD, Pauli BU. 2006. The putative chloride channel hCLCA2 has a single C-terminal transmembrane segment. *J Biol Chem* 281(40):29448-29454.
- Engler JR, Hughes TP, White DL. 2011. OCT-1 as a determinant of response to antileukemic treatment. *Clin Pharmacol Ther* 89(4):608-611.
- Erickson P, Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondi S, Lasher R, Trujillo J, Rowley J, Drabkin H. 1992. Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. *Blood* 80(7):1825-1831.

- Ernst T, Chase A, Zoi K, Waghorn K, Hidalgo-Curtis C, Score J, Jones A, Grand F, Reiter A, Hochhaus A, Cross NC. 2010. Transcription factor mutations in myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 95(9):1473-1480.
- Fattah F, Lee EH, Weisensel N, Wang Y, Lichter N, Hendrickson EA. 2010. Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells. *PLoS Genet* 6(2):e1000855.
- Fears S, Gavin M, Zhang DE, Hetherington C, Ben-David Y, Rowley JD, Nucifora G. 1997. Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5):1949-1954.
- Fears S, Mathieu C, Zeleznik-Le N, Huang S, Rowley JD, Nucifora G. 1996. Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4):1642-1647.
- Felix CA, Kolaris CP, Osheroff N. 2006. Topoisomerase II and the etiology of chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10):1093-1108.
- Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B, Wang L, Westendorf JJ, Downing JR, Hiebert SW. 1999. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* 19(10):6566-6574.
- Ferraro F, Celso CL, Scadden D. 2010. Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol* 695:155-168.
- Fischer M, Schwieger M, Horn S, Niebuhr B, Ford A, Roscher S, Bergholz U, Greaves M, Lohler J, Stocking C. 2005. Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* 24(51):7579-7591.
- Fonatsch C. 2010. The role of chromosome 21 in hematology and oncology. *Genes Chromosomes Cancer* 49(6):497-508.
- Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, Greaves M. 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.
- Forestier E, Heyman M, Andersen MK, Autio K, Blennow E, Borgstrom G, Golovleva I, Heim S, Heinonen K, Hovland R, Johannsson JH, Kerndrup G, Nordgren A, Rosenquist R, Swolin B, Johansson B. 2008. Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival. *Br J Haematol* 140(6):665-672.
- Fortier JM, Payton JE, Cahan P, Ley TJ, Walter MJ, Graubert TA. 2010. POU4F1 is associated with t(8;21) acute myeloid leukemia and contributes directly to its unique transcriptional signature. *Leukemia* 24(5):950-957.
- Foster N, Paulsson K, Sales M, Cunningham J, Groves M, O'Connor N, Begum S, Stubbs T, McMullan DJ, Griffiths M, Pratt N, Tauro S. 2010. Molecular characterisation of a recurrent, semi-cryptic RUNX1 translocation t(7;21) in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 148(6):938-943.
- Frank R, Zhang J, Uchida H, Meyers S, Hiebert SW, Nimer SD. 1995. The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene* 11(12):2667-2674.

- Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Rock J, Paschka P, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Spath D, Kundgen A, Schmidt-Wolf IG, Gotze K, Nachbaur D, Pfreundschuh M, Horst HA, Dohner H, Dohner K. 2011. RUNX1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Results From a Comprehensive Genetic and Clinical Analysis From the AML Study Group. *J Clin Oncol* 29(10):1364-1372.
- Gandillet A, Park S, Lassailly F, Griessinger E, Vargaftig J, Filby A, Lister TA, Bonnet D. 2011. Heterogeneous sensitivity of human acute myeloid leukemia to beta-catenin down-modulation. *Leukemia* 25(5):770-780.
- Gao J, Erickson P, Gardiner K, Le Beau MM, Diaz MO, Patterson D, Rowley JD, Drabkin HA. 1991. Isolation of a yeast artificial chromosome spanning the 8;21 translocation breakpoint t(8;21)(q22;q22.3) in acute myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11):4882-4886.
- Gekas C, Rhodes KE, Van Handel B, Chhabra A, Ueno M, Mikkola HK. 2010. Hematopoietic stem cell development in the placenta. *Int J Dev Biol* 54(6-7):1089-1098.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Aceto N, Remy V, Pinson S, Houdayer C, Arnoulet C, Sainty D, Bentires-Alj M, Olschwang S, Vey N, Mozziconacci MJ, Birnbaum D, Chaffanet M. 2008. Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC Cancer* 8:299.
- Gibson A, Lewis AP, Affleck K, Aitken AJ, Meldrum E, Thompson N. 2005. hCLCA1 and mCLCA3 are secreted non-integral membrane proteins and therefore are not ion channels. *J Biol Chem* 280(29):27205-27212.
- Giguere A, Hebert J. 2010. CLCA2, a novel RUNX1 partner gene in a therapy-related leukemia with t(1;21)(p22;q22). *Cancer Genet Cytogenet* 202(2):94-100.
- Giguere A, Hebert J. 2011. Microhomologies and topoisomerase II consensus sequences identified near the breakpoint junctions of the recurrent t(7;21)(p22;q22) translocation in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 50(4):228-238.
- Goldfarb AN. 2009. Megakaryocytic programming by a transcriptional regulatory loop: A circle connecting RUNX1, GATA-1, and P-TEFb. *J Cell Biochem* 107(3):377-382.
- Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG. 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 TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. 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.
- Griffiths EA, Gore SD, Hooker C, McDevitt MA, Karp JE, Smith BD, Mohammad HP, Ye Y, Herman JG, Carraway HE. 2010. Acute myeloid leukemia is characterized by Wnt pathway inhibitor promoter hypermethylation. *Leuk Lymphoma* 51(9):1711-1719.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK. 2010. Refinement of cytogenetic classification in acute

- myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 116(3):354-365.
- Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH. 2001. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 98(5):1312-1320.
- Groschel S, Lugthart S, Schlenk RF, Valk PJ, Eiwen K, Goudswaard C, van Putten WJ, Kayser S, Verdonck LF, Lubbert M, Ossenkoppele GJ, Germing U, Schmidt-Wolf I, Schlegelberger B, Krauter J, Ganser A, Dohner H, Lowenberg B, Dohner K, Delwel R. 2010. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J Clin Oncol* 28(12):2101-2107.
- Grossmann V, Kern W, Harbich S, Alpermann T, Jeromin S, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T, Kohlmann A. 2011a. Prognostic relevance of RUNX1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 96(12):1874-1877.
- Grossmann V, Kohlmann A, Klein H, Schindela S, Schnittger S, Dugas M, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. 2010. Targeted Next-Generation Sequencing and Genome-Wide High-Resolution Copy Number DNA Arrays Allow the Identification of Five Novel RUNX1 Fusions In Hematological Malignancies. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 116:Abstract 1193.
- Grossmann V, Kohlmann A, Klein HU, Schindela S, Schnittger S, Dicker F, Dugas M, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. 2011b. Targeted next-generation sequencing detects point mutations, insertions, deletions and balanced chromosomal rearrangements as well as identifies novel leukemia-specific fusion genes in a single procedure. *Leukemia* 25(4):671-680.
- Growney JD, Shigematsu H, Li Z, Lee BH, Adelsperger J, Rowan R, Curley DP, Kutok JL, Akashi K, Williams IR, Speck NA, Gilliland DG. 2005. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* 106(2):494-504.
- Gruber AD, Pauli BU. 1999. Tumorigenicity of human breast cancer is associated with loss of the Ca²⁺-activated chloride channel CLCA2. *Cancer Res* 59(21):5488-5491.
- Guastadisegni MC, Lonoce A, Impera L, Di Terlizzi F, Fugazza G, Aliano S, Grasso R, Cluzeau T, Raynaud S, Rocchi M, Storlazzi CT. 2010. CBFA2T2 and C20orf112: two novel fusion partners of RUNX1 in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 24(8):1516-1519.
- Guo H, Friedman AD. 2010. Myeloid Expansion In the Absence of RUNX1 Is Associated with Increased Monopoiesis, Reduced Granulopoiesis, and Diminished CEBPA Gene Expression, Effects of Potential Relevance to Myeloid Transformation *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 116(21):3147.
- Hackanson B, Bennett KL, Brena RM, Jiang J, Claus R, Chen SS, Blagitko-Dorfs N, Maharry K, Whitman SP, Schmittgen TD, Lubbert M, Marcucci G, Bloomfield CD,

- Plass C. 2008. Epigenetic modification of CCAAT/enhancer binding protein alpha expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 68(9):3142-3151.
- Haefliger S, Klebig C, Schaubitzer K, Schardt J, Timchenko N, Mueller BU, Pabst T. 2011. Protein disulfide isomerase blocks CEBPA translation and is up-regulated during the unfolded protein response in AML. *Blood* 117(22):5931-5940.
- Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li XC, Babic M, Lin M, Carmagnac A, Lee YK, Kok CH, Gagliardi L, Friend KL, Ekert PG, Butcher CM, Brown AL, Lewis ID, To LB, Timms AE, Storek J, Moore S, Atree M, Escher R, Bardy PG, Suthers GK, D'Andrea RJ, Horwitz MS, Scott HS. 2011. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 43(10):1012-1017.
- Harada Y, Harada H. 2009. Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. *J Cell Physiol* 220(1):16-20.
- Hasan SK, Ottone T, Schlenk RF, Xiao Y, Wiemels JL, Mitra ME, Bernasconi P, Di Raimondo F, Stanghellini MT, Marco P, Mays AN, Dohner H, Sanz MA, Amadori S, Grimwade D, Lo-Coco F. 2010. Analysis of t(15;17) chromosomal breakpoint sequences in therapy-related versus de novo acute promyelocytic leukemia: association of DNA breaks with specific DNA motifs at PML and RARA loci. *Genes Chromosomes Cancer* 49(8):726-732.
- Hazourli S, Chagnon P, Sauvageau M, Fetni R, Busque L, Hebert J. 2006. Overexpression of PRDM16 in the presence and absence of the RUNX1/PRDM16 fusion gene in myeloid leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 45(11):1072-1076.
- Helbling D, Mueller BU, Timchenko NA, Hagemeyer A, Jotterand M, Meyer-Monard S, Lister A, Rowley JD, Huegli B, Fey MF, Pabst T. 2004. The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EVI1 suppresses CEBPA in acute myeloid leukemia by activation of Calreticulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(36):13312-13317.
- Helbling D, Mueller BU, Timchenko NA, Schardt J, Eyer M, Betts DR, Jotterand M, Meyer-Monard S, Fey MF, Pabst T. 2005. CBFβ-SMMHC is correlated with increased calreticulin expression and suppresses the granulocytic differentiation factor CEBPA in AML with inv(16). *Blood* 106(4):1369-1375.
- Higuchi M, O'Brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ, Downing JR. 2002. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 1(1):63-74.
- Hock AK, Vigneron AM, Carter S, Ludwig RL, Vousden KH. 2011. Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42. *Embo J* 30(24):4921-4930.
- Hock H, Meade E, Medeiros S, Schindler JW, Valk PJ, Fujiwara Y, Orkin SH. 2004. Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* 18(19):2336-2341.
- Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, Green J, Colman S, Piacibello W, Buckle V, Tsuzuki S, Greaves M, Enver T. 2008. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 319(5861):336-339.

- Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Lee MC, Tang JL, Chen CY, Chou WC, Huang CF, Lee FY, Liu MC, Yao M, Tien HF. 2011. Distinct association between aberrant methylation of Wnt inhibitors and genetic alterations in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 105(12):1927-1933.
- Hromas R, Busse T, Carroll A, Mack D, Shopnick R, Zhang DE, Nakshatri H, Richkind K. 2001. Fusion AML1 transcript in a radiation-associated leukemia results in a truncated inhibitory AML1 protein. *Blood* 97(7):2168-2170.
- Huang G, Shigesada K, Ito K, Wee HJ, Yokomizo T, Ito Y. 2001. Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Embo J* 20(4):723-733.
- Huang G, Zhang P, Hirai H, Elf S, Yan X, Chen Z, Koschmieder S, Okuno Y, Dayaram T, Growney JD, Shivdasani RA, Gilliland DG, Speck NA, Nimer SD, Tenen DG. 2008. PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nat Genet* 40(1):51-60.
- Huber RD, Gao B, Sidler Pfandler MA, Zhang-Fu W, Leuthold S, Hagenbuch B, Folkers G, Meier PJ, Stieger B. 2007. Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(2):C795-806.
- Huntly BJ, Shigematsu H, Deguchi K, Lee BH, Mizuno S, Duclos N, Rowan R, Amaral S, Curley D, Williams IR, Akashi K, Gilliland DG. 2004. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* 6(6):587-596.
- Ichikawa H, Tanabe K, Mizushima H, Hayashi Y, Mizutani S, Ishii E, Hongo T, Kikuchi A, Satake M. 2006. Common gene expression signatures in t(8;21)- and inv(16)-acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 135(3):336-347.
- Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M, Hirai H. 2004. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 10(3):299-304.
- Ichikawa M, Goyama S, Asai T, Kawazu M, Nakagawa M, Takeshita M, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M. 2008. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol* 180(7):4402-4408.
- Imagama S, Abe A, Suzuki M, Hayakawa F, Katsumi A, Emi N, Kiyoi H, Naoe T. 2007. LRP16 is fused to RUNX1 in monocytic leukemia cell line with t(11;21)(q13;q22). *Eur J Haematol* 79(1):25-31.
- Imai Y, Kurokawa M, Yamaguchi Y, Izutsu K, Nitta E, Mitani K, Satake M, Noda T, Ito Y, Hirai H. 2004. The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol* 24(3):1033-1043.
- International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature., Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. 2009. ISCN 2009 : an international system for human cytogenetic nomenclature (2009). Basel ; Unionville, CT: Karger. vi, 138 , 131 folded leave p.

- Ito Y. 1999. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells* 4(12):685-696.
- Ito Y. 2004. Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene* 23(24):4198-4208.
- Izutsu K KM, Imai Y, Ichikawa M, Asai T, Maki K, Mitani K, Hirai H. 2002. The t(3;21) fusion product, AML1/Evi-1 blocks AML1-induced transactivation by recruiting CtBP. *Oncogene* 21(17):2695-2703.
- Jeandidier E, Dastugue N, Mugneret F, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Herens C, Michaux L, Verellen-Dumoulin C, Talmant P, Cornillet-Lefebvre P, Luquet I, Charrin C, Barin C, Collonge-Rame MA, Perot C, Van den Akker J, Gregoire MJ, Jonveaux P, Baranger L, Eclache-Saudreau V, Pages MP, Cabrol C, Terre C, Berger R. 2006. Abnormalities of the long arm of chromosome 21 in 107 patients with hematopoietic disorders: a collaborative retrospective study of the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Cancer Genet Cytogenet* 166(1):1-11.
- Jeandidier E, Gervais C, Radford-Weiss I, Gangneux C, Rimelen V, Jung G, Harzallah I, Drenou B, Lioure B, Mauvieux L. 2010. Three Novel AML Cases Harboring the Semi-Cryptic t(7;21)(p22;q22) Translocation Expressing RUNX1-USP42 Fusion Transcripts Associated with Diploidy/Tetraploidy and/or 5q Alterations: a Probably Underestimated Combination. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 116(21):2708.
- Jeannet G, Scheller M, Scarpellino L, Duboux S, Gardiol N, Back J, Kuttler F, Malanchi I, Birchmeier W, Leutz A, Huelsken J, Held W. 2008. Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of beta-catenin and gamma-catenin. *Blood* 111(1):142-149.
- Joannides M, Grimwade D. 2010. Molecular biology of therapy-related leukaemias. *Clin Transl Oncol* 12(1):8-14.
- Joo HY, Zhai L, Yang C, Nie S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chang C, Wang H. 2007. Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination. *Nature* 449(7165):1068-1072.
- Khalade A, Jaakkola MS, Pukkala E, Jaakkola JJ. 2010. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health* 9:31.
- Kim DH, Popradi G, Sriharsha L, Kamel-Reid S, Chang H, Messner HA, Lipton JH. 2008. No significance of derivative chromosome 9 deletion on the clearance kinetics of BCR/ABL fusion transcripts, cytogenetic or molecular response, loss of response, or treatment failure to imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Cancer* 113(4):772-781.
- Kim YK, Kim YS, Yoo KJ, Lee HJ, Lee DR, Yeo CY, Baek KH. 2007. The expression of Usp42 during embryogenesis and spermatogenesis in mouse. *Gene Expr Patterns* 7(1-2):143-148.
- Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M. 1998. Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *Embo J* 17(11):2994-3004.

- Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO, Uchida H, Nimer SD. 1996. The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24):14059-14064.
- Knezevich S. 2005. ETV6 (ETS variant gene 6 (TEL oncogene)). In: *Haematol. AGCO*, editor: INIST.
- Kohlmann A, Schoch C, Dugas M, Schnittger S, Hiddemann W, Kern W, Haferlach T. 2005. New insights into MLL gene rearranged acute leukemias using gene expression profiling: shared pathways, lineage commitment, and partner genes. *Leukemia* 19(6):953-964.
- Koipally J, Georgopoulos K. 2000. Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J Biol Chem* 275(26):19594-19602.
- Komander D, Clague MJ, Urbe S. 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):550-563.
- Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. 2009. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol* 27(4):619-628.
- Krivtsov AV, Armstrong SA. 2007. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 7(11):823-833.
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442(7104):818-822.
- Kunzelmann K. 2005. Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 205(3):159-173.
- Kuo MC, Liang DC, Huang CF, Shih YS, Wu JH, Lin TL, Shih LY. 2009. RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia* 23(8):1426-1431.
- Kurokawa M, Mitani K, Irie K, Matsuyama T, Takahashi T, Chiba S, Yazaki Y, Matsumoto K, Hirai H. 1998. The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. *Nature* 394(6688):92-96.
- Kwok C, Zeisig BB, Dong S, So CW. 2006. Forced homo-oligomerization of RARalpha leads to transformation of primary hematopoietic cells. *Cancer Cell* 9(2):95-108.
- Kwok C, Zeisig BB, Qiu J, Dong S, So CW. 2009. Transforming activity of AML1-ETO is independent of CBFbeta and ETO interaction but requires formation of homo-oligomeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(8):2853-2858.
- LaFiura KM, Edwards H, Taub JW, Matherly LH, Fontana JA, Mohamed AN, Ravindranath Y, Ge Y. 2008. Identification and characterization of novel AML1-ETO fusion transcripts in pediatric t(8;21) acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Oncogene* 27(36):4933-4942.
- Lahlil R, Lecuyer E, Herblot S, Hoang T. 2004. SCL assembles a multifactorial complex that determines glycoporphin A expression. *Mol Cell Biol* 24(4):1439-1452.
- Lam EY, Hall CJ, Crosier PS, Crosier KE, Flores MV. 2010. Live imaging of Runx1 expression in the dorsal aorta tracks the emergence of blood progenitors from endothelial cells. *Blood* 116(6):909-914.

- Lanctot C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8(2):104-115.
- Lang F, Foller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM. 2005. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol* 205(3):147-157.
- Lang F, Huber SM, Szabo I, Gulbins E. 2007. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. *Arch Biochem Biophys* 462(2):189-194.
- Langer T, Metzler M, Reinhardt D, Viehmann S, Borkhardt A, Reichel M, Stanulla M, Schrappe M, Creutzig U, Ritter J, Leis T, Jacobs U, Harbott J, Beck JD, Rascher W, Repp R. 2003. Analysis of t(9;11) chromosomal breakpoint sequences in childhood acute leukemia: almost identical MLL breakpoints in therapy-related AML after treatment without etoposides. *Genes Chromosomes Cancer* 36(4):393-401.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367(6464):645-648.
- Lee-Theilen M, Matthews AJ, Kelly D, Zheng S, Chaudhuri J. 2010. CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination. *Nat Struct Mol Biol* 18(1):75-79.
- Lee EJ, Pollak A, Leavitt RD, Testa JR, Schiffer CA. 1987. Minimally differentiated acute nonlymphocytic leukemia: a distinct entity. *Blood* 70(5):1400-1406.
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. 2007. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131(7):1235-1247.
- Lee LK, Ueno M, Van Handel B, Mikkola HK. 2010. Placenta as a newly identified source of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* 17(4):313-318.
- Lee YJ, Kim JH, Bae S, Rho SK, Choe SY. 2004. Mechanism of transcriptional repression by TEL/RUNX1 fusion protein. *Mol Cells* 17(2):217-222.
- Levanon D, GG, Bangsow T, Ben-Asher E, Male DA, Avidan N, Bangsow C, Hattori M, Taylor TD, Taudien S, Blechschmidt K, Shimizu N, Rosenthal A, Sakaki Y, Lancet D, Groner Y. . 2001. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene* 262(1-2):23-33.
- Levanon D, Groner Y. 2004. Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* 23(24):4211-4219.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. 2010. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 363(25):2424-2433.

- Li X, Cowell JK, Sossey-Alaoui K. 2004. CLCA2 tumour suppressor gene in 1p31 is epigenetically regulated in breast cancer. *Oncogene* 23(7):1474-1480.
- Licht JD. 2001. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene* 20(40):5660-5679.
- Lieber MR. 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 79:181-211.
- Lieber MR, Gu J, Lu H, Shimazaki N, Tsai AG. 2010. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem* 50:279-296.
- Lieber MR, Yu K, Raghavan SC. 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.
- Liedtke M, Cleary ML. 2009. Therapeutic targeting of MLL. *Blood* 113(24):6061-6068.
- Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju BG, Ohgi K, Zhang J, Rose DW, Fu XD, Glass CK, Rosenfeld MG. 2009. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell* 139(6):1069-1083.
- Linggi B, Muller-Tidow C, van de Locht L, Hu M, Nip J, Serve H, Berdel WE, van der Reijden B, Quelle DE, Rowley JD, Cleveland J, Jansen JH, Pandolfi PP, Hiebert SW. 2002. The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 8(7):743-750.
- Liu X, Zhang Q, Zhang DE, Zhou C, Xing H, Tian Z, Rao Q, Wang M, Wang J. 2009. Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia* 23(4):739-745.
- Liu Y, Cheney MD, Gaudet JJ, Chruszcz M, Lukasik SM, Sugiyama D, Lary J, Cole J, Dauter Z, Minor W, Speck NA, Bushweller JH. 2006. The tetramer structure of the Nervy homology two domain, NHR2, is critical for AML1/ETO's activity. *Cancer Cell* 9(4):249-260.
- Loewen ME, Forsyth GW. 2005. Structure and function of CLCA proteins. *Physiol Rev* 85(3):1061-1092.
- Lorsbach RB, Moore J, Ang SO, Sun W, Lenny N, Downing JR. 2004. Role of RUNX1 in adult hematopoiesis: analysis of RUNX1-IRES-GFP knock-in mice reveals differential lineage expression. *Blood* 103(7):2522-2529.
- Lovett BD, Lo Nigro L, Rappaport EF, Blair IA, Osheroff N, Zheng N, Megonigal MD, Williams WR, Nowell PC, Felix CA. 2001. Near-precise interchromosomal recombination and functional DNA topoisomerase II cleavage sites at MLL and AF-4 genomic breakpoints in treatment-related acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17):9802-9807.
- Lugthart S, Groschel S, Beverloo HB, Kayser S, Valk PJ, van Zelderen-Bhola SL, Jan Ossenkoppele G, Vellenga E, van den Berg-de Ruyter E, Schanz U, Verhoef G, Vandenberghe P, Ferrant A, Kohne CH, Pfreundschuh M, Horst HA, Koller E, von Lilienfeld-Toal M, Bentz M, Ganser A, Schlegelberger B, Jotterand M, Krauter J, Pabst T, Theobald M, Schlenk RF, Delwel R, Dohner K, Lowenberg B, Dohner H. 2010. Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type

- inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 28(24):3890-3898.
- Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CA, Valk PJ, Beverloo HB, Lowenberg B, Delwel R. 2008. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood* 111(8):4329-4337.
- Mace G, Briot D, Guervilly JH, Rosselli F. 2007. [Fanconi anemia: cellular and molecular features]. *Pathol Biol (Paris)* 55(1):19-28.
- Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X, Sam L, Barrette T, Palanisamy N, Chinnaiyan AM. 2009a. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 458(7234):97-101.
- Maher CA, Palanisamy N, Brenner JC, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Luo S, Khrebtukova I, Barrette TR, Grasso C, Yu J, Lonigro RJ, Schroth G, Kumar-Sinha C, Chinnaiyan AM. 2009b. Chimeric transcript discovery by paired-end transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(30):12353-12358.
- Maki K, Yamagata T, Asai T, Yamazaki I, Oda H, Hirai H, Mitani K. 2005. Dysplastic definitive hematopoiesis in AML1/EVI1 knock-in embryos. *Blood* 106(6):2147-2155.
- Maki K, Yamagata T, Mitani K. 2008. Role of the RUNX1-EVI1 fusion gene in leukemogenesis. *Cancer Sci* 99(10):1878-1883.
- Maki K, Yamagata T, Yamazaki I, Oda H, Mitani K. 2006. Development of megakaryoblastic leukaemia in Runx1-Evi1 knock-in chimaeric mouse. *Leukemia* 20(8):1458-1460.
- Malik TH, Shoichet SA, Latham P, Kroll TG, Peters LL, Shivdasani RA. 2001. Transcriptional repression and developmental functions of the atypical vertebrate GATA protein TRPS1. *Embo J* 20(7):1715-1725.
- Mani RS, Chinnaiyan AM. 2010. Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat Rev Genet* 11(12):819-829.
- Mani RS, Tomlins SA, Callahan K, Ghosh A, Nyati MK, Varambally S, Palanisamy N, Chinnaiyan AM. 2009. Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science* 326(5957):1230.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. 2009. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 361(11):1058-1066.
- Marks DI, Paietta EM, Moorman AV, Richards SM, Buck G, DeWald G, Ferrando A, Fielding AK, Goldstone AH, Ketterling RP, Litzow MR, Luger SM, McMillan AK, Mansour MR, Rowe JM, Tallman MS, Lazarus HM. 2009. T-cell acute

- lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood* 114(25):5136-5145.
- Marschalek R. 2010. Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *Br J Haematol* 152(2):141-154.
- Mathew S, Head D, Rubnitz JE, Raimondi SC. 2000. Concurrent translocations of MLL and CBFA2 (AML1) genes with new partner breakpoints in a child with secondary myelodysplastic syndrome after treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 28(2):227-232.
- Mattarucchi E, Guerini V, Rambaldi A, Campiotti L, Venco A, Pasquali F, Lo Curto F, Porta G. 2008. Microhomologies and interspersed repeat elements at genomic breakpoints in chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 47(7):625-632.
- Mayani H, Flores-Figueroa E, Chavez-Gonzalez A. 2009. In vitro biology of human myeloid leukemia. *Leuk Res* 33(5):624-637.
- McClendon AK, Osheroff N. 2007. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res* 623(1-2):83-97.
- McNeil S, Zeng C, Harrington KS, Hiebert S, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS. 1999. The t(8;21) chromosomal translocation in acute myelogenous leukemia modifies intranuclear targeting of the AML1/CBFalpha2 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26):14882-14887.
- Mendlovic F, Conconi M. 2011. Calreticulin: a Multifaceted Protein. *Nature Education* 4(1):1.
- Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Delabesse E, de Oliveira MP, Cave H, Clappier E, van Dongen JJ, Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Beverloo HB, Panzer-Grumayer R, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Kjeldsen E, Schnittger S, Koehl U, Gruhn B, Heidenreich O, Chan LC, Yip SF, Krzywinski M, Eckert C, Moricke A, Schrappe M, Alonso CN, Schafer BW, Krauter J, Lee DA, Zur Stadt U, Te Kronnie G, Sutton R, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Lo Nigro L, Tsaur G, Fechina L, Szczepanski T, Strehl S, Ilencikova D, Molkentin M, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R. 2009. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 23(8):1490-1499.
- Mikesch JH, Steffen B, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. 2007. The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 21(8):1638-1647.
- Mikhail FM, Coignet L, Hatem N, Mourad ZI, Farawela HM, El Kaffash DM, Farahat N, Nucifora G. 2004. A novel gene, FGA7, is fused to RUNX1/AML1 in a t(4;21)(q28;q22) in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 39(2):110-118.
- Mikhail FM, Sinha KK, Sauntharajah Y, Nucifora G. 2006. Normal and transforming functions of RUNX1: a perspective. *J Cell Physiol* 207(3):582-593.
- Milne TA, Kim J, Wang GG, Stadler SC, Basrur V, Whitcomb SJ, Wang Z, Ruthenburg AJ, Elenitoba-Johnson KS, Roeder RG, Allis CD. 2010. Multiple interactions

- recruit MLL1 and MLL1 fusion proteins to the HOXA9 locus in leukemogenesis. *Mol Cell* 38(6):853-863.
- Minke KS, Staib P, Puetter A, Gehrke I, Gandhirajan RK, Schlosser A, Schmitt EK, Hallek M, Kreuzer KA. 2009. Small molecule inhibitors of WNT signaling effectively induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Eur J Haematol* 82(3):165-175.
- Mistry AR, Felix CA, Whitmarsh RJ, Mason A, Reiter A, Cassinat B, Parry A, Walz C, Wiemels JL, Segal MR, Ades L, Blair IA, Osheroff N, Peniket AJ, Lafage-Pochitaloff M, Cross NC, Chomienne C, Solomon E, Fenaux P, Grimwade D. 2005. DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 352(15):1529-1538.
- Mitani K. 2004. Molecular mechanisms of leukemogenesis by AML1/EVI-1. *Oncogene* 23(24):4263-4269.
- Mitani K, Ogawa S, Tanaka T, Miyoshi H, Kurokawa M, Mano H, Yazaki Y, Ohki M, Hirai H. 1994. Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. *Embo J* 13(3):504-510.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 7(4):233-245.
- Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. 2000. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13):7521-7526.
- Miyauchi N, Saito A, Karasawa T, Harita Y, Suzuki K, Koike H, Han GD, Shimizu F, Kawachi H. 2006. Synaptic vesicle protein 2B is expressed in podocyte, and its expression is altered in proteinuric glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 17(10):2748-2759.
- Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, Yokoyama K, Soeda E, Ohki M. 1995. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res* 23(14):2762-2769.
- Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. 1991. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23):10431-10434.
- Momeni P, Glockner G, Schmidt O, von Holtum D, Albrecht B, Gillissen-Kaesbach G, Hennekam R, Meinecke P, Zabel B, Rosenthal A, Horsthemke B, Ludecke HJ. 2000. Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Nat Genet* 24(1):71-74.
- Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, Vora A, Mitchell CD, Harrison CJ. 2010. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 11(5):429-438.
- Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M. 2002. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12):8242-8247.
- Morishita K. 2007. Leukemogenesis of the EVI1/MEL1 gene family. *Int J Hematol* 85(4):279-286.

- Morrow M, Horton S, Kioussis D, Brady HJ, Williams O. 2004. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood* 103(10):3890-3896.
- Morrow M, Samanta A, Kioussis D, Brady HJ, Williams O. 2007. TEL-AML1 preleukemic activity requires the DNA binding domain of AML1 and the dimerization and corepressor binding domains of TEL. *Oncogene* 26(30):4404-4414.
- Mucenski ML, Taylor BA, Ihle JN, Hartley JW, Morse HC, 3rd, Jenkins NA, Copeland NG. 1988. Identification of a common ecotropic viral integration site, Evi-1, in the DNA of AKXD murine myeloid tumors. *Mol Cell Biol* 8(1):301-308.
- Muller-Tidow C, Steffen B, Cauvet T, Tickenbrock L, Ji P, Diederichs S, Sargin B, Kohler G, Stelljes M, Puccetti E, Ruthardt M, deVos S, Hiebert SW, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H. 2004. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 24(7):2890-2904.
- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. 2007. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446(7137):758-764.
- Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, White D, Hughes TP, Le Beau MM, Pui CH, Relling MV, Shurtleff SA, Downing JR. 2008. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 453(7191):110-114.
- Mulloy JC, Cammenga J, MacKenzie KL, Berguido FJ, Moore MA, Nimer SD. 2002. The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood* 99(1):15-23.
- Murga Penas EM, Cools J, Algenstaedt P, Hinz K, Seeger D, Schafhausen P, Schilling G, Marynen P, Hossfeld DK, Dierlamm J. 2003. A novel cryptic translocation t(12;17)(p13;p12-p13) in a secondary acute myeloid leukemia results in a fusion of the ETV6 gene and the antisense strand of the PER1 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 37(1):79-83.
- Nadal N, Stephan JL, Cornillon J, Guyotat D, Flandrin P, Campos L. 2008. RUNX1 rearrangements in acute myeloblastic leukemia relapsing after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Genet Cytogenet* 180(2):168-169.
- Nambu T, Hamada A, Nakashima R, Yuki M, Kawaguchi T, Mitsuya H, Saito H. 2011. Association of SLCO1B3 polymorphism with intracellular accumulation of imatinib in leukocytes in patients with chronic myeloid leukemia. *Biol Pharm Bull* 34(1):114-119.
- Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A, Parreira L. 1999. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 93(4):1197-1207.
- Nguyen TT, Ma LN, Slovak ML, Bangs CD, Cherry AM, Arber DA. 2006. Identification of novel Runx1 (AML1) translocation partner genes SH3D19, YTHDF2, and ZNF687 in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 45(10):918-932.

- Nijman SM L-VM, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R. . 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123(5):773-786.
- Nimer SD, Moore MA. 2004. Effects of the leukemia-associated AML1-ETO protein on hematopoietic stem and progenitor cells. *Oncogene* 23(24):4249-4254.
- Nitta E, Izutsu K, Yamaguchi Y, Imai Y, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H. 2005. Oligomerization of Evi-1 regulated by the PR domain contributes to recruitment of corepressor CtBP. *Oncogene* 24(40):6165-6173.
- North T, Gu TL, Stacy T, Wang Q, Howard L, Binder M, Marin-Padilla M, Speck NA. 1999. Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* 126(11):2563-2575.
- O'Neil J, Tchinda J, Gutierrez A, Moreau L, Maser RS, Wong KK, Li W, McKenna K, Liu XS, Feng B, Neuberg D, Silverman L, DeAngelo DJ, Kutok JL, Rothstein R, DePinho RA, Chin L, Lee C, Look AT. 2007. Alu elements mediate MYB gene tandem duplication in human T-ALL. *J Exp Med* 204(13):3059-3066.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84(2):321-330.
- Oliveira AM, Perez-Atayde AR, Dal Cin P, Gebhardt MC, Chen CJ, Neff JR, Demetri GD, Rosenberg AE, Bridge JA, Fletcher JA. 2005. Aneurysmal bone cyst variant translocations upregulate USP6 transcription by promoter swapping with the ZNF9, COL1A1, TRAP150, and OMD genes. *Oncogene* 24(21):3419-3426.
- Oliveira AM, Perez-Atayde AR, Inwards CY, Medeiros F, Derr V, Hsi BL, Gebhardt MC, Rosenberg AE, Fletcher JA. 2004. USP6 and CDH11 oncogenes identify the neoplastic cell in primary aneurysmal bone cysts and are absent in so-called secondary aneurysmal bone cysts. *Am J Pathol* 165(5):1773-1780.
- Olsen M, Madsen HO, Hjalgrim H, Gregers J, Rostgaard K, Schmiegelow K. 2006. Preleukemic TEL-AML1-positive clones at cell level of 10⁽⁻³⁾ to 10⁽⁻⁴⁾ do not persist into adulthood. *J Pediatr Hematol Oncol* 28(11):734-740.
- Orkin SH, Zon LI. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132(4):631-644.
- Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, Fraser P. 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet* 36(10):1065-1071.
- Osborne CS, Chakalova L, Mitchell JA, Horton A, Wood AL, Bolland DJ, Corcoran AE, Fraser P. 2007. Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol* 5(8):e192.
- Ottersbach K, Smith A, Wood A, Gottgens B. 2009. Ontogeny of haematopoiesis: recent advances and open questions. *Br J Haematol* 148(3):343-355.
- Owen C. 2010. Insights into familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy (FPD/AML). *Leuk Res* 34(2):141-142.
- Pabst T, Mueller BU. 2007. Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. *Oncogene* 26(47):6829-6837.

- Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, Tenen DG. 2001. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 7(4):444-451.
- Panagopoulos I, Mertens F, Lofvenberg R, Mandahl N. 2008. Fusion of the COL1A1 and USP6 genes in a benign bone tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 180(1):70-73.
- Park H, Seo Y, Kim JI, Kim WJ, Choe SY. 2006. Identification of the nuclear localization motif in the ETV6 (TEL) protein. *Cancer Genet Cytogenet* 167(2):117-121.
- Park IJ, Park JE, Kim HJ, Jung HJ, Lee WG, Cho SR. 2010. Acute myeloid leukemia with t(16;21)(q24;q22) and eosinophilia: case report and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 196(1):105-108.
- Park SH, Chi HS, Min SK, Park BG, Jang S, Park CJ. 2011. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 35(10):1376-1383.
- Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrozek K, Chen H, Kittles RA, Vukosavljevic T, Perrotti D, Vardiman JW, Carroll AJ, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD. 2006. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 24(24):3904-3911.
- Paulien S, Maarek O, Daniel MT, Berger R. 2002. A novel translocation, t(9;21)(q13;q22) rearranging the RUNX1 gene in acute myelomonocytic leukemia. *Ann Genet* 45(2):67-69.
- Paulsson K, Bekassy AN, Olofsson T, Mitelman F, Johansson B, Panagopoulos I. 2006. A novel and cytogenetically cryptic t(7;21)(p22;q22) in acute myeloid leukemia results in fusion of RUNX1 with the ubiquitin-specific protease gene USP42. *Leukemia* 20(2):224-229.
- Paulsson K, Cazier JB, Macdougall F, Stevens J, Stasevich I, Vrcelj N, Chaplin T, Lillington DM, Lister TA, Young BD. 2008. Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: Unexpected similarities with pediatric disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(18):6708-6713.
- Perdomo J, Crossley M. 2002. The Ikaros family protein Eos associates with C-terminal-binding protein corepressors. *Eur J Biochem* 269(23):5885-5892.
- Perrotti D, Cesi V, Trotta R, Guerzoni C, Santilli G, Campbell K, Iervolino A, Condorelli F, Gambacorti-Passerini C, Caligiuri MA, Calabretta B. 2002. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* 30(1):48-58.
- Peterson LF, Boyapati A, Ahn EY, Biggs JR, Okumura AJ, Lo MC, Yan M, Zhang DE. 2007a. Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood* 110(3):799-805.
- Peterson LF, Yan M, Zhang DE. 2007b. The p21Waf1 pathway is involved in blocking leukemogenesis by the t(8;21) fusion protein AML1-ETO. *Blood* 109(10):4392-4398.
- Peterson LF, Zhang DE. 2004. The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene* 23(24):4255-4262.

- Piccione M, Niceta M, Antona V, Di Fiore A, Cariola F, Gentile M, Corsello G. 2009. Identification of two new mutations in TRPS 1 gene leading to the tricho-rhino-phalangeal syndrome type I and III. *Am J Med Genet A* 149A(8):1837-1841.
- Pigazzi M, Masetti R, Bresolin S, Beghin A, Di Meglio A, Gelain S, Trentin L, Baron E, Giordan M, Zangrando A, Buldini B, Leszl A, Putti MC, Rizzari C, Locatelli F, Pession A, Te Kronnie G, Basso G. 2011. MLL partner genes drive distinct gene expression profiles and genomic alterations in pediatric acute myeloid leukemia: an AIEOP study. *Leukemia* 25(3):560-563.
- Poirel H, Oury C, Carron C, Duprez E, Laabi Y, Tsapis A, Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. 1997. The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene* 14(3):349-357.
- Poland KS, Shardy DL, Azim M, Naeem R, Krance RA, Dreyer ZE, Neeley ES, Zhang N, Qiu YH, Kornblau SM, Plon SE. 2009. Overexpression of ZNF342 by juxtaposition with MPO promoter/enhancer in the novel translocation t(17;19)(q23;q13.32) in pediatric acute myeloid leukemia and analysis of ZNF342 expression in leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 48(6):480-489.
- Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 17(5):421-433.
- Postigo AA, Dean DC. 1999. ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12):6683-6688.
- Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, Philippe N, Roche-Lestienne C, Boissel N, Dhedin N, Andre JM, Cornillet-Lefebvre P, Baruchel A, Mozziconacci MJ, Sobol H. 2009. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood* 113(22):5583-5587.
- Qian Z, Joslin JM, Tennant TR, Reshmi SC, Young DJ, Stoddart A, Larson RA, Le Beau MM. 2010. Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia. *Chem Biol Interact* 184(1-2):50-57.
- Quentin S, Cucchini W, Ceccaldi R, Nibourel O, Pondarre C, Pages MP, Vasquez N, Dubois d'Enghien C, Larghero J, Peffault de Latour R, Rocha V, Dalle JH, Schneider P, Michallet M, Michel G, Baruchel A, Sigaux F, Gluckman E, Leblanc T, Stoppa-Lyonnet D, Preudhomme C, Socie G, Soulier J. 2011. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood* 117(15):e161-170.
- Quesada V D-PA, Gutierrez-Fernandez A, Garabaya C, Cal S, Lopez-Otin C. . 2004. Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun*. 314(1):54-62.
- Quesada V, Diaz-Perales A, Gutierrez-Fernandez A, Garabaya C, Cal S, Lopez-Otin C. 2004. Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 314(1):54-62.
- Quintas-Cardama A, Cortes J. 2009. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113(8):1619-1630.
- Radvanyi L, Singh-Sandhu D, Gallichan S, Lovitt C, Pedyczak A, Mallo G, Gish K, Kwok K, Hanna W, Zubovits J, Armes J, Venter D, Hakimi J, Shortreed J, Donovan M,

- Parrington M, Dunn P, Oomen R, Tartaglia J, Berinstein NL. 2005. The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(31):11005-11010.
- Raffini LJ, Slater DJ, Rappaport EF, Lo Nigro L, Cheung NK, Biegel JA, Nowell PC, Lange BJ, Felix CA. 2002. Panhandle and reverse-panhandle PCR enable cloning of der(11) and der(other) genomic breakpoint junctions of MLL translocations and identify complex translocation of MLL, AF-4, and CDK6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7):4568-4573.
- Raghavan SC, Chastain P, Lee JS, Hegde BG, Houston S, Langen R, Hsieh CL, Haworth IS, Lieber MR. 2005. Evidence for a triplex DNA conformation at the bcl-2 major breakpoint region of the t(14;18) translocation. *J Biol Chem* 280(24):22749-22760.
- Raghavan SC, Swanson PC, Wu X, Hsieh CL, Lieber MR. 2004. A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature* 428(6978):88-93.
- Ramirez J, Lukin K, Hagman J. 2010. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr Opin Immunol* 22(2):177-184.
- Ramsey H, Zhang DE, Richkind K, Burcoglu-O'Ral A, Hromas R. 2003. Fusion of AML1/Runx1 to copine VIII, a novel member of the copine family, in an aggressive acute myelogenous leukemia with t(12;21) translocation. *Leukemia* 17(8):1665-1666.
- Reckzeh K, Cammenga J. 2010. Molecular mechanisms underlying deregulation of C/EBPalpha in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 91(4):557-568.
- Reikvam H, Hatfield KJ, Kittang AO, Hovland R, Bruserud O. 2011. Acute myeloid leukemia with the t(8;21) translocation: clinical consequences and biological implications. *J Biomed Biotechnol* 2011:104631.
- Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. 2009. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78:363-397.
- Rho JK, Kim JH, Yu J, Choe SY. 2002. Correlation between cellular localization of TEL/AML1 fusion protein and repression of AML1-mediated transactivation of CR1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 297(1):91-95.
- Rho JK, Yu J, Choe SY. 2002. Correlation between cellular localization of TEL/AML1 fusion protein and repression of AML1-mediated transactivation of CR1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 297(1):91-95.
- Richkind K, Hromas R, Lytle C, Crenshaw D, Velasco J, Roherty S, Srinivasiah J, Varella-Garcia M. 2000. Identification of two new translocations that disrupt the AML1 gene. *Cancer Genet Cytogenet* 122(2):141-143.
- Robbiani DF, Bothmer A, Callen E, Reina-San-Martin B, Dorsett Y, Difilippantonio S, Bolland DJ, Chen HT, Corcoran AE, Nussenzweig A, Nussenzweig MC. 2008. AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 135(6):1028-1038.
- Roche-Lestienne C, Deluche L, Corm S, Tigaud I, Joha S, Philippe N, Geffroy S, Lai JL, Nicolini FE, Preudhomme C. 2008. RUNX1 DNA-binding mutations and RUNX1-PRDM16 cryptic fusions in BCR-ABL+ leukemias are frequently associated with

- secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance. *Blood* 111(7):3735-3741.
- Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA. 1995. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 86(11):4263-4269.
- Roth DB, Wilson JH. 1986. Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol Cell Biol* 6(12):4295-4304.
- Roulston D, Espinosa R, 3rd, Nucifora G, Larson RA, Le Beau MM, Rowley JD. 1998. CBFA2(AML1) translocations with novel partner chromosomes in myeloid leukemias: association with prior therapy. *Blood* 92(8):2879-2885.
- Rowley JD. 1973. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet* 16(2):109-112.
- Rubin CM, Larson RA, Bitter MA, Carrino JJ, Le Beau MM, Diaz MO, Rowley JD. 1987. Association of a chromosomal 3;21 translocation with the blast phase of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 70(5):1338-1342.
- Rubnitz J, Subramani S. 1984. The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 4(11):2253-2258.
- Rudiger NS, Gregersen N, Kielland-Brandt MC. 1995. One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic chi. *Nucleic Acids Res* 23(2):256-260.
- Sakai I, Tamura T, Narumi H, Uchida N, Yakushijin Y, Hato T, Fujita S, Yasukawa M. 2005. Novel RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a patient with acute myeloid leukemia showing t(1;21)(p36;q22). *Genes Chromosomes Cancer* 44(3):265-270.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 3 v. p.
- Sasaki K, Yagi H, Bronson RT, Tominaga K, Matsunashi T, Deguchi K, Tani Y, Kishimoto T, Komori T. 1996. Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22):12359-12363.
- Schiffer R, Neis M, Holler D, Rodriguez F, Geier A, Gartung C, Lammert F, Dreuw A, Zwadlo-Klarwasser G, Merk H, Jugert F, Baron JM. 2003. Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120(2):285-291.
- Schindler JW, Van Buren D, Foudi A, Krejci O, Qin J, Orkin SH, Hock H. 2009. TEL-AML1 corrupts hematopoietic stem cells to persist in the bone marrow and initiate leukemia. *Cell Stem Cell* 5(1):43-53.
- Schnittger S, Dicker F, Kern W, Wendland N, Sundermann J, Alpermann T, Haferlach C, Haferlach T. 2011. RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood* 117(8):2348-2357.
- Schoch C, Kohlmann A, Schnittger S, Brors B, Dugas M, Mergenthaler S, Kern W, Hiddemann W, Eils R, Haferlach T. 2002. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15):10008-10013.

- Schuringa JJ. 2010. Tracing C/EBPalpha+ cells and their progeny. *Blood* 116(20):4038-4039.
- Senyuk V LD, Zakharov A, Mikhail FM, Nucifora G. 2005. The distal zinc finger domain of AML1/MDS1/EVI1 is an oligomerization domain involved in induction of hematopoietic differentiation defects in primary cells in vitro. *Cancer Res.* 65(17):7603-7611.
- Senyuk V, Li D, Zakharov A, Mikhail FM, Nucifora G. 2005. The distal zinc finger domain of AML1/MDS1/EVI1 is an oligomerization domain involved in induction of hematopoietic differentiation defects in primary cells in vitro. *Cancer Res* 65(17):7603-7611.
- Senyuk V, Sinha KK, Chakraborty S, Buonamici S, Nucifora G. 2003. P/CAF and GCN5 acetylate the AML1/MDS1/EVI1 fusion oncoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 307(4):980-986.
- Serinsoz E, Neusch M, Busche G, Wasielewski R, Kreipe H, Bock O. 2004. Aberrant expression of beta-catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 126(3):313-319.
- Shinawi M, Erez A, Shardy DL, Lee B, Naeem R, Weissenberger G, Chinault AC, Cheung SW, Plon SE. 2008. Syndromic thrombocytopenia and predisposition to acute myelogenous leukemia caused by constitutional microdeletions on chromosome 21q. *Blood* 112(4):1042-1047.
- Shing DC, Trubia M, Marchesi F, Radaelli E, Belloni E, Tapinassi C, Scanziani E, Mecucci C, Crescenzi B, Lahortiga I, Odero MD, Zardo G, Gruszka A, Minucci S, Di Fiore PP, Pelicci PG. 2007. Overexpression of sPRDM16 coupled with loss of p53 induces myeloid leukemias in mice. *J Clin Invest* 117(12):3696-3707.
- Slovak ML, Bedell V, Popplewell L, Arber DA, Schoch C, Slater R. 2002. 21q22 balanced chromosome aberrations in therapy-related hematopoietic disorders: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer* 33(4):379-394.
- Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. 2004. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 351(23):2403-2407.
- Soumen Chakraborty KKS, Vitalyi Senyuk, Giuseppina Nucifora. 2003. SUV39H1 interacts with AML1 and abrogates AML1 transactivity. AML1 is methylated in vivo. *Oncogene* 22(34):5229-5237.
- Sperry AO, Blasquez VC, Garrard WT. 1989. Dysfunction of chromosomal loop attachment sites: illegitimate recombination linked to matrix association regions and topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(14):5497-5501.
- Spitzner JR, Muller MT. 1988. A consensus sequence for cleavage by vertebrate DNA topoisomerase II. *Nucleic Acids Res* 16(12):5533-5556.
- Staal FJ, Clevers HC. 2005. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* 5(1):21-30.
- Stam RW, Schneider P, Hagelstein JA, van der Linden MH, Stumpel DJ, de Menezes RX, de Lorenzo P, Valsecchi MG, Pieters R. 2010. Gene expression profiling-based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants. *Blood* 115(14):2835-2844.

- Stevens-Kroef MJ, Schoenmakers EF, van Kraaij M, Huys E, Vermeulen S, van der Reijden B, van Kessel AG. 2006. Identification of truncated RUNX1 and RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a case of t(1;21)(p36;q22)-positive therapy-related AML. *Leukemia* 20(6):1187-1189.
- Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. 2000. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9):4790-4795.
- Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, Caligiuri MA. 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.
- Sun W, Downing JR. 2004. Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors. *Blood* 104(12):3565-3572.
- Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. 2008. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 439 p.
- Swiers G, De Bruijn M, Speck NA. 2010. Hematopoietic stem cell emergence in the conceptus and the role of Runx1. *Int J Dev Biol* 54(6-7):1151-1163.
- Takeshita M IM, Nitta E, Goyama S, Asai T, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M. 2008. AML1-Evi-1 specifically transforms hematopoietic stem cells through fusion of the entire Evi-1 sequence to AML1. *Leukemia* 22(6):1241-1249.
- Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Nishida J, Shibata Y, Yazaki Y, Hirai H. 1995. An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *Embo J* 14(2):341-350.
- Tang JL, Hou HA, Chen CY, Liu CY, Chou WC, Tseng MH, Huang CF, Lee FY, Liu MC, Yao M, Huang SY, Ko BS, Hsu SC, Wu SJ, Tsay W, Chen YC, Lin LI, Tien HF. 2009. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood* 114(26):5352-5361.
- Tenen DG. 2003. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3(2):89-101.
- Thandla SP, Ploski JE, Raza-Egilmez SZ, Chhalliyil PP, Block AW, de Jong PJ, Aplan PD. 1999. ETV6-AML1 translocation breakpoints cluster near a purine/pyrimidine repeat region in the ETV6 gene. *Blood* 93(1):293-299.
- Thol F, Damm F, Ludeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, Yun H, Gohring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lubbert M, Kanz L, Fiedler W, Kirchner H, Heil G, Krauter J, Ganser A, Heuser M. 2011. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 29(21):2889-2896.
- Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. 2004. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 104(12):3739-3745.
- Tijssen MR, Cvejic A, Joshi A, Hannah RL, Ferreira R, Forrai A, Bellissimo DC, Oram SH, Smethurst PA, Wilson NK, Wang X, Ottersbach K, Stemple DL, Green AR,

- Ouwehand WH, Gottgens B. 2011. Genome-wide analysis of simultaneous GATA1/2, RUNX1, FLI1, and SCL binding in megakaryocytes identifies hematopoietic regulators. *Dev Cell* 20(5):597-609.
- Timchenko LT, Iakova P, Welm AL, Cai ZJ, Timchenko NA. 2002. Calreticulin interacts with C/EBPalpha and C/EBPbeta mRNAs and represses translation of C/EBP proteins. *Mol Cell Biol* 22(20):7242-7257.
- Timchenko N, Wilson DR, Taylor LR, Abdelsayed S, Wilde M, Sawadogo M, Darlington GJ. 1995. Autoregulation of the human C/EBP alpha gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding. *Mol Cell Biol* 15(3):1192-1202.
- Tokita K, Maki K, Mitani K. 2007. RUNX1/EVI1, which blocks myeloid differentiation, inhibits CCAAT-enhancer binding protein alpha function. *Cancer Sci* 98(11):1752-1757.
- Tonks A, Pearn L, Musson M, Gilkes A, Mills KI, Burnett AK, Darley RL. 2007. Transcriptional dysregulation mediated by RUNX1-RUNX1T1 in normal human progenitor cells and in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 21(12):2495-2505.
- Tsuzuki S, Hong D, Gupta R, Matsuo K, Seto M, Enver T. 2007. Isoform-specific potentiation of stem and progenitor cell engraftment by AML1/RUNX1. *PLoS Med* 4(5):e172.
- Uchida H, Downing JR, Miyazaki Y, Frank R, Zhang J, Nimer SD. 1999. Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 promoter. *Oncogene* 18(4):1015-1022.
- Unniraman S, Schatz DG. 2006. AID and Igh switch region-Myc chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10):1259-1264.
- van den Bemd GJ, Jhamai M, Brinkmann AO, Chang GT. 2003. The atypical GATA protein TRPS1 represses androgen-induced prostate-specific antigen expression in LNCaP prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312(3):578-584.
- van der Crabben S, van Binsbergen E, Ausems M, Poot M, Bierings M, Buijs A. 2010. Constitutional RUNX1 deletion presenting as non-syndromic thrombocytopenia with myelodysplasia: 21q22 ITSN1 as a candidate gene in mental retardation. *Leuk Res* 34(1):e8-12.
- van der Weyden L, Giotopoulos G, Rust AG, Matheson LS, van Delft FW, Kong J, Corcoran AE, Greaves MF, Mullighan CG, Huntly BJ, Adams DJ. 2011. Modeling the evolution of ETV6-RUNX1-induced B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in mice. *Blood* 118(4):1041-1051.
- Van Maele-Fabry G, Lantin AC, Hoet P, Lison D. 2010. Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: A systematic review and meta-analysis. *Environ Int.*
- Vangala RK, Heiss-Neumann MS, Rangatia JS, Singh SM, Schoch C, Tenen DG, Hiddemann W, Behre G. 2003. The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood* 101(1):270-277.
- von Goessel H, Jacobs U, Semper S, Krumbholz M, Langer T, Keller T, Schrauder A, van der Velden VH, van Dongen JJ, Harbott J, Panzer-Grumayer ER, Schrappe M, Rascher W, Metzler M. 2009. Cluster analysis of genomic ETV6-RUNX1 (TEL-

- AML1) fusion sites in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 33(8):1082-1088.
- Walia V, Ding M, Kumar S, Nie D, Premkumar LS, Elble RC. 2009. hCLCA2 Is a p53-Inducible Inhibitor of Breast Cancer Cell Proliferation. *Cancer Res* 69(16):6624-6632.
- Walter MJ, Payton JE, Ries RE, Shannon WD, Deshmukh H, Zhao Y, Baty J, Heath S, Westervelt P, Watson MA, Tomasson MH, Nagarajan R, O'Gara BP, Bloomfield CD, Mrozek K, Selzer RR, Richmond TA, Kitzman J, Geoghegan J, Eis PS, Maupin R, Fulton RS, McLellan M, Wilson RK, Mardis ER, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Ley TJ. 2009. Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31):12950-12955.
- Wan QF, Zhou ZY, Thakur P, Vila A, Sherry DM, Janz R, Heidelberger R. 2010. SV2 acts via presynaptic calcium to regulate neurotransmitter release. *Neuron* 66(6):884-895.
- Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM. 1998. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18):10860-10865.
- Wang L, Gural A, Sun XJ, Zhao X, Perna F, Huang G, Hatlen MA, Vu L, Liu F, Xu H, Asai T, Xu H, Deblasio T, Menendez S, Voza F, Jiang Y, Cole PA, Zhang J, Melnick A, Roeder RG, Nimer SD. 2011a. The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation. *Science* 333(6043):765-769.
- Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH. 1997. Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *Embo J* 16(14):4374-4383.
- Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. 1996a. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8):3444-3449.
- Wang Q, Stacy T, Miller JD, Lewis AF, Gu TL, Huang X, Bushweller JH, Bories JC, Alt FW, Ryan G, Liu PP, Wynshaw-Boris A, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. 1996b. The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell* 87(4):697-708.
- Wang QF, Wu G, Mi S, He F, Wu J, Dong J, Luo RT, Mattison R, Kaberlein JJ, Prabhakar S, Ji H, Thirman MJ. 2011b. MLL fusion proteins preferentially regulate a subset of wild-type MLL target genes in the leukemic genome. *Blood* 117(25):6895-6905.
- Wang Y, Krivtsov AV, Sinha AU, North TE, Goessling W, Feng Z, Zon LI, Armstrong SA. 2010. The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science* 327(5973):1650-1653.
- Watanabe-Okochi N, Kitaura J, Ono R, Harada H, Harada Y, Komeno Y, Nakajima H, Nosaka T, Inaba T, Kitamura T. 2008. AML1 mutations induced MDS and MDS/AML in a mouse BMT model. *Blood* 111(8):4297-4308.
- Weinberg OK, Arber DA. 2010. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia* 24(11):1844-1851.
- Weterings E, Chen DJ. 2008. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 18(1):114-124.

- Whitmarsh RJ, Saginario C, Zhuo Y, Hilgenfeld E, Rappaport EF, Megonigal MD, Carroll M, Liu M, Osheroff N, Cheung NK, Slater DJ, Ried T, Knutsen T, Blair IA, Felix CA. 2003. Reciprocal DNA topoisomerase II cleavage events at 5'-TATTA-3' sequences in MLL and AF-9 create homologous single-stranded overhangs that anneal to form der(11) and der(9) genomic breakpoint junctions in treatment-related AML without further processing. *Oncogene* 22(52):8448-8459.
- Wichmann C, Becker Y, Chen-Wichmann L, Vogel V, Vojtkova A, Herglotz J, Moore S, Koch J, Lausen J, Mantele W, Gohlke H, Grez M. 2010. Dimer-tetramer transition controls RUNX1/ETO leukemogenic activity. *Blood* 116(4):603-613.
- Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. 1999. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 354(9189):1499-1503.
- Wilson NK, Foster SD, Wang X, Knezevic K, Schutte J, Kaimakis P, Chilarska PM, Kinston S, Ouwehand WH, Dzierzak E, Pimanda JE, de Bruijn MF, Gottgens B. 2010. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* 7(4):532-544.
- Wojiski S, Guibal FC, Kindler T, Lee BH, Jesneck JL, Fabian A, Tenen DG, Gilliland DG. 2009. PML-RARalpha initiates leukemia by conferring properties of self-renewal to committed promyelocytic progenitors. *Leukemia* 23(8):1462-1471.
- Xiao Z, Greaves MF, Buffler P, Smith MT, Segal MR, Dicks BM, Wiencke JK, Wiemels JL. 2001. Molecular characterization of genomic AML1-ETO fusions in childhood leukemia. *Leukemia* 15(12):1906-1913.
- Xu G, Kanezaki R, Toki T, Watanabe S, Takahashi Y, Terui K, Kitabayashi I, Ito E. 2006. Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Leukemia* 20(6):1002-1008.
- Xu XQ, Wang JM, Lu SQ, Chen L, Yang JM, Zhang WP, Song XM, Hou J, Ni X, Qiu HY. 2009. Clinical and biological characteristics of adult biphenotypic acute leukemia in comparison with that of acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a case series of a Chinese population. *Haematologica* 94(7):919-927.
- Yamashita N, Osato M, Huang L, Yanagida M, Kogan SC, Iwasaki M, Nakamura T, Shigesada K, Asou N, Ito Y. 2005. Haploinsufficiency of Runx1/AML1 promotes myeloid features and leukaemogenesis in BXH2 mice. *Br J Haematol* 131(4):495-507.
- Yan M, Ahn EY, Hiebert SW, Zhang DE. 2009. RUNX1/AML1 DNA-binding domain and ETO/MTG8 NHR2-dimerization domain are critical to AML1-ETO9a leukemogenesis. *Blood* 113(4):883-886.
- Yan M, Burel SA, Peterson LF, Kanbe E, Iwasaki H, Boyapati A, Hines R, Akashi K, Zhang DE. 2004. Deletion of an AML1-ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49):17186-17191.
- Yan M, Kanbe E, Peterson LF, Boyapati A, Miao Y, Wang Y, Chen IM, Chen Z, Rowley JD, Willman CL, Zhang DE. 2006. A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis. *Nat Med* 12(8):945-949.

- Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, Shi JY, Zhu YM, Tang L, Zhang XW, Liang WX, Mi JQ, Song HD, Li KQ, Chen Z, Chen SJ. 2011. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 43(4):309-315.
- Yang XJ. 2004. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* 32(3):959-976.
- Ye Y, Pringle LM, Lau AW, Riquelme DN, Wang H, Jiang T, Lev D, Welman A, Blobel GA, Oliveira AM, Chou MM. 2010. TRE17/USP6 oncogene translocated in aneurysmal bone cyst induces matrix metalloproteinase production via activation of NF-kappaB. *Oncogene* 29(25):3619-3629.
- Yergeau DA, Hetherington CJ, Wang Q, Zhang P, Sharpe AH, Binder M, Marin-Padilla M, Tenen DG, Speck NA, Zhang DE. 1997. Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. *Nat Genet* 15(3):303-306.
- Yeung J, Esposito MT, Gandillet A, Zeisig BB, Griessinger E, Bonnet D, So CW. 2010. beta-Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem cells. *Cancer Cell* 18(6):606-618.
- Yokomizo T, Ogawa M, Osato M, Kanno T, Yoshida H, Fujimoto T, Fraser S, Nishikawa S, Okada H, Satake M, Noda T, Nishikawa S, Ito Y. 2001. Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells. *Genes Cells* 6(1):13-23.
- Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, De Toni F, Prade-Houdellier N, Ruidavets JB, Mansat-De Mas V, Rigal-Huguet F, Laurent G, Payrastra B, Manenti S, Racaud-Sultan C. 2006. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia* 20(7):1211-1216.
- Yuan J, Luo K, Zhang L, Cheville JC, Lou Z. 2010. USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53. *Cell* 140(3):384-396.
- Zeng C, McNeil S, Pockwinse S, Nickerson J, Shopland L, Lawrence JB, Penman S, Hiebert S, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. 1998. Intranuclear targeting of AML/CBFalpha regulatory factors to nuclear matrix-associated transcriptional domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4):1585-1589.
- Zeng C, van Wijnen AJ, Stein JL, Meyers S, Sun W, Shopland L, Lawrence JB, Penman S, Lian JB, Stein GS, Hiebert SW. 1997. Identification of a nuclear matrix targeting signal in the leukemia and bone-related AML/CBF-alpha transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):6746-6751.
- Zent C, Kim N, Hiebert S, Zhang DE, Tenen DG, Rowley JD, Nucifora G. 1996a. Rearrangement of the AML1/CBFA2 gene in myeloid leukemia with the 3;21 translocation: expression of co-existing multiple chimeric genes with similar functions as transcriptional repressors, but with opposite tumorigenic properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 211:243-252.
- Zent CS, Mathieu C, Claxton DF, Zhang DE, Tenen DG, Rowley JD, Nucifora G. 1996b. The chimeric genes AML1/MDS1 and AML1/EAP inhibit AML1B activation at the CSF1R promoter, but only AML1/MDS1 has tumor-promoter properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3):1044-1048.

- Zhang F, Carvalho CM, Lupski JR. 2009a. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet* 25(7):298-307.
- Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR. 2009b. The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet* 41(7):849-853.
- Zhang M, Swanson PC. 2008. V(D)J recombinase binding and cleavage of cryptic recombination signal sequences identified from lymphoid malignancies. *J Biol Chem* 283(11):6717-6727.
- Zhang Y, Emmanuel N, Kamboj G, Chen J, Shurafa M, Van Dyke DL, Wiktor A, Rowley JD. 2004. PRDX4, a member of the peroxiredoxin family, is fused to AML1 (RUNX1) in an acute myeloid leukemia patient with a t(X;21)(p22;q22). *Genes Chromosomes Cancer* 40(4):365-370.
- Zhang Y, Rowley JD. 2006. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10):1282-1297.
- Zhang Y, Strissel P, Strick R, Chen J, Nucifora G, Le Beau MM, Larson RA, Rowley JD. 2002. Genomic DNA breakpoints in AML1/RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5):3070-3075.
- Zhao X, Jankovic V, Gural A, Huang G, Pardani A, Menendez S, Zhang J, Dunne R, Xiao A, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Nimer SD. 2008. Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev* 22(5):640-653.
- Zharlyganova D, Harada H, Harada Y, Shinkarev S, Zhumadilov Z, Zhunusova A, Tchaizhunosova NJ, Apsalikov KN, Kemaikin V, Zhumadilov K, Kawano N, Kimura A, Hoshi M. 2008. High frequency of AML1/RUNX1 point mutations in radiation-associated myelodysplastic syndrome around Semipalatinsk nuclear test site. *J Radiat Res (Tokyo)* 49(5):549-555.
- Zheng X, Beissert T, Kukoc-Zivojnov N, Puccetti E, Altschmied J, Strolz C, Boehrer S, Gul H, Schneider O, Ottmann OG, Hoelzer D, Henschler R, Ruthardt M. 2004. Gamma-catenin contributes to leukemogenesis induced by AML-associated translocation products by increasing the self-renewal of very primitive progenitor cells. *Blood* 103(9):3535-3543.
- Zhou RH, Wang P, Zou Y, Jackson-Cook CK, Povirk LF. 1997. A precise interchromosomal reciprocal exchange between hot spots for cleavable complex formation by topoisomerase II in amsacrine-treated Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 57(21):4699-4702.
- Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, French WJ, Turlo KA, Yang Y, Becker MS, Zanetta L, Dejana E, Gasson JC, Tallquist MD, Iruela-Arispe ML. 2008. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 3(6):625-636.