



HAL
open science

Identification du partenaire de RUNX1 dans une leucémie aiguë myéloïde avec translocation t(8;21)(q22;q22) atypique n'impliquant pas le gène RUNX1T1 par utilisation de techniques cytogénétiques et de biologie moléculaire de Q-PCR, 3'RACE PCR et de séquençage

Lucille Altounian

► **To cite this version:**

Lucille Altounian. Identification du partenaire de RUNX1 dans une leucémie aiguë myéloïde avec translocation t(8;21)(q22;q22) atypique n'impliquant pas le gène RUNX1T1 par utilisation de techniques cytogénétiques et de biologie moléculaire de Q-PCR, 3'RACE PCR et de séquençage. Sciences du Vivant [q-bio]. 2014. hal-01732697

HAL Id: hal-01732697

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732697>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

*Présenté et soutenu publiquement
dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée*

par

Lucille ALTOUNIAN

Le 28 octobre 2014

**Identification du partenaire de *RUNX1* dans une leucémie aiguë myéloïde avec
translocation t(8;21)(q22;q22) atypique n'impliquant pas le gène *RUNX1T1* par utilisation
de techniques cytogénétiques et de biologie moléculaire de Q-PCR, 3'RACE PCR et de
séquençage**

*Conformément aux dispositions du décret n°90-810
du 10 septembre 1990, ce mémoire tient lieu de :*

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Examineurs de la thèse :

Monsieur le Professeur Philippe Jonveaux

Président

Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin

}

Madame le Docteur en Médecine Caroline Bonmati

} Juges

Monsieur le Docteur en Pharmacie Marc Muller

}



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**



FACULTÉ de MÉDECINE
NANCY

**Président de l'Université de Lorraine :
Professeur Pierre MUTZENHARDT**

**Doyen de la Faculté de Médecine :
Professeur Henry COUDANE**

Vice-Doyen « Finances » : Professeur Marc BRAUN
Vice-Doyen « Formation permanente » : Professeur Hervé VESPIGNANI
Vice-Doyen « Vie étudiante » : M. Pierre-Olivier BRICE

Assesseurs :

- 1 ^{er} Cycle et délégué FMN Paces :	Docteur Mathias POUSSEL
- 2 ^{ème} Cycle :	Mme la Professeure Marie-Reine LOSSER
- 3 ^{ème} Cycle :	Professeur Marc DEBOUVERIE
• « <i>DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques</i> »	Professeur Associé Paolo DI PATRIZIO
• « <i>DES Spécialité Médecine Générale</i> »	Mme la Professeure I. CHARY-VALKENAERE
• « <i>Gestion DU – DIU</i> »	Professeur Bruno LEHEUP
- Plan campus :	Professeur Laurent BRESLER
- Ecole de chirurgie et nouvelles pédagogies :	Professeur Didier MAINARD
- Recherche :	Professeur Jacques HUBERT
- Relations Internationales :	Docteur Christophe NEMOS
- Mono appartenants, filières professionnalisantes :	Docteur Stéphane ZUILY
- Vie Universitaire et Commission vie Facultaire :	Mme la Docteure Frédérique CLAUDOT
- Affaires juridiques, modernisation et gestions partenaires externes:	Mme la Professeure Annick BARBAUD
- Réingénierie professions paramédicales :	Mme la Professeure Annick BARBAUD

DOYENS HONORAIRES

Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY
 Marc-André BIGARD - Patrick BOISSEL – Pierre BORDIGONI - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE
 Jean-Louis BOUTROY - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT - François CHERRIER
 Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS
 Jean DUHEILLE - Jean-Bernard DUREUX - Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH
 Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ
 Oliéro GUERCI - Claude HURIET - Christian JANOT - Michèle KESSLER - Jacques LACOSTE
 Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre LEDERLIN
 Bernard LEGRAS - Jean-Pierre MALLIÉ - Michel MANCIAUX - Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU - Michel MERLE
 Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN
 Gilbert PERCEBOIS - Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON – François PLENAT - Jean-Marie POLU
 Jacques POUREL Jean PREVOT - Francis RAPHAEL - Antoine RASPILLER – Denis REGENT - Michel RENARD
 Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT - Michel SCHWEITZER - Claude SIMON
 Danièle SOMMELET - Jean-François STOLTZ - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT- Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ
 Gérard VAILLANT - Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET – Jean-Pierre VILLEMOT - Michel WAYOFF
 Michel WEBER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Gérard BARROCHE - Professeur Marc-André BIGARD – Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE
 Professeur Jacques LECLÈRE - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD - Professeur Jacques POUREL
 Professeur Michel SCHMITT - Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT - Professeure Colette VIDAILHET
 Professeur Michel VIDAILHET - Professeur Michel WAYOFF

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Gilles GROSDIDIER - Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Professeur Bernard FOLIGUET – Professeur Christo CHRISTOV

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médecine)

Professeur Michel CLAUDON – Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER - Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIIEWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et Mycologie)

Professeure Marie MACHOUART

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD – Professeure Céline PULCINI

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeur François KOHLER (jusqu'au 1^{er} novembre) – Professeure Eliane ALBUISSON – Professeur Nicolas JAY (à partir du 1^{er} novembre)

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY - Professeur Didier PEIFFERT

Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie - réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Gérard AUDIBERT

Professeur Thomas FUCHS-BUDER – Professeure Marie-Reine LOSSER

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET – Professeur J.Y. JOUZEAU (pharmacien)

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Hervé VESPIGNANI - Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE
Professeur Luc TAILLANDIER - Professeur Louis MAILLARD – Professeure Louise TYVAERT

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN
Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC (*jusqu'au 1^{er} novembre*) – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD - Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénérologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeure Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE

Professeur Nicolas SADOUL - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Thierry FOLLIGUET

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeure Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE ET CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY - Professeur Athanase BENETOS

Professeure Gisèle KANNY – Professeure Christine PERRET-GUILLAUME

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET

Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO – Professeure Rachel VIEUX

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Olivier MOREL

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)

Professeur Roger JANKOWSKI – Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER

2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeure Karine ANGIOI

3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)
Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeure Muriel BRIX
=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL
Professeur Walter BLONDEL

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER
=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur Jean-Marc BOIVIN

PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur associé Paolo DI PATRIZIO
=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteure Manuela PEREZ

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Docteur Edouard BARRAT - Docteure Françoise TOUATI – Docteure Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Docteure Aude MARCHAL – Docteur Guillaume GAUCHOTTE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Docteur Jean-Claude MAYER - Docteur Jean-Marie ESCANYE

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médecine)

Docteur Damien MANDRY – Docteur Pedro TEIXEIRA (stagiaire)

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN

Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA – Docteur Abderrahim OUSSALAH (stagiaire)

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Docteur Mathias POUSSSEL – Docteure Silvia VARECHOVA

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)

Docteure Véronique VENARD – Docteure Hélène JEULIN – Docteure Corentine ALAUZET

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie (type mixte : biologique))

Docteure Anne DEBOURGOGNE (sciences)

3^{ème} sous-section : (Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales)

Docteure Sandrine HENARD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteure Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN –

Docteure Nelly AGRINIER (stagiaire)

2^{ème} sous-section (Médecine et Santé au Travail)

Docteure Isabelle THAON

3^{ème} sous-section (Médecine légale et droit de la santé)

Docteur Laurent MARTRILLE

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion : option hématologique (type mixte : clinique))

Docteur Aurore PERROT (stagiaire)

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique)

Docteure Lina BOLOTINE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteure Céline BONNET

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Docteure Françoise LAPICQUE – Docteur Nicolas GAMBIER – Docteur Julien SCALA-BERTOLA

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Docteure Anne-Christine RAT

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénérologie)

Docteure Anne-Claire BURSZTEJN

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire)

Docteur Fabrice VANHUYSE

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Docteur Stéphane ZUILY

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Docteur Jean-Baptiste CHEVAUX (*stagiaire*)

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Docteure Laure JOLY

=====

MAÎTRE DE CONFÉRENCE DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Docteure Elisabeth STEYER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES

Monsieur Vincent LHUILLIER

19^{ème} Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Joëlle KIVITS

60^{ème} Section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE, GÉNIE CIVIL

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Madame Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Monsieur Nick RAMALANJAONA

65^{ème} Section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Monsieur Jean-Louis GELLY - Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE

Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA - Madame Nathalie MERCIER – Madame Céline HUSELSTEIN

66^{ème} Section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteure Sophie SIEGRIST - Docteur Arnaud MASSON - Docteur Pascal BOUCHE

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
*Research Institute for Mathematical Sciences de
Kyoto (JAPON)*

Professeure Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS
(1996)
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)
Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume-Uni)
Professeur Yunfeng ZHOU (2009)
Université de Wuhan (CHINE)
Professeur David ALPERS (2011)
Université de Washington (U.S.A)
Professeur Martin EXNER (2012)
Université de Bonn (ALLEMAGNE)

REMERCIEMENTS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le professeur Philippe Jonveaux

Professeur en Médecine Génétique médicale

*Vous nous faites l'honneur de juger et présider cette thèse.
Nous vous remercions de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à notre travail.
Veuillez recevoir l'expression de notre respect et de notre profonde reconnaissance.*

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le professeur Jean-Louis Merlin

Professeur en Pharmacie Unité de biologie des tumeurs

*Vous nous faites l'honneur de juger cette thèse et d'apporter vos connaissances à la critique
de ce travail.*

Veillez recevoir l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

A NOTRE JUGE

Madame le docteur Caroline Bonmati

Docteur en Médecine Hématologie clinique

*Vous nous faites l'honneur de juger cette thèse.
Veuillez recevoir l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.*

A NOTRE JUGE

Monsieur le docteur Marc Muller

Docteur en Pharmacie Onco-hématologie

Vous nous faites l'honneur de juger cette thèse.

Vous avez accepté d'encadrer ce travail, de le corriger et de nous conseiller.

Nous vous remercions pour votre disponibilité, votre confiance et votre bonne humeur.

Veillez recevoir l'expression de notre sincère et profonde reconnaissance.

Aux professionnels médecins et pharmaciens qui m'ont accueilli dans leurs services et qui m'ont enseigné le savoir faire et le savoir être du biologiste :

A Madame le Professeur Sophie Raynaud

Vous avez accepté de nous recevoir et de nous intégrer dans votre service. Vous nous avez appris les secrets de la FISH. De plus, vous vous êtes intéressée à notre travail de thèse et vous nous avez conseillé.

Veillez recevoir l'expression de notre reconnaissance et de notre respect

A Madame le Docteur Brigitte Dousset

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour les connaissances que vous nous avez apporté, les conseils et le soutien que vous nous avez prodigué et l'accueil que vous nous avez réservé.

A Madame le Docteur Anne Staal

Vous nous avez fait découvrir et apprécier la cytogénétique et l'onco-hématologie.

Vous nous avez consacré du temps et nous avez fait confiance. Veillez accepter l'expression de notre sincère reconnaissance

A Madame l'ingénieure Michèle Chéry

Vous nous avez fait partager avec bonne humeur votre savoir et votre amour des chromosomes.

Veillez accepter l'expression de notre respect et de notre reconnaissance.

A Nathalie,

Ton expérience de technicienne hors pair et ta patience ont été des aides si précieuses.

Merci.

A Séverine, Chantale, Alice, Elise, Emilie.....et Lila

A ma famille,

*Mes parents, qui ont cru en moi et fait ce que je suis aujourd'hui. Vous m'avez guidé et porté
lorsque je ne le pouvais plus.
Merci pour votre soutien et votre amour éternel.*

A mon frère Jean-Baptiste et Caroline, pour leurs attentions et leur écoute.

*A mes cousins, cousines, oncles et tantes, parrain et marraine, merci pour tous vos précieux
conseils.*

A mes grands parents, celle qui reste et tous ceux qui sont partis trop tôt...

A Loïc,

Ma surprise lorraine

Et mes amis...

*Diane, Camille, Florence, Hélène... merci pour tous les bons moments passés ensemble sur
les bancs de la fac et ailleurs.*

*Pascale, Christelle, Agnès et Anthony parce que j'ai adoré travailler avec vous et que j'ai
beaucoup appris de vos expériences. Merci.*

*Aux internes de la promotion 2010 : Elise, Cynthia, Valérie, Dimitri.... et
Aux plus jeunes : Lucile, Alain, Julien, Caro.... pour l'excellente ambiance qui règne dans ce
groupe dans le travail comme dans les soirées.*

SERMENT

« Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque ».

Table des matières

1	Introduction	24
2	Notions générales.....	25
2.1	Leucémies aiguës myéloïdes.....	25
2.1.1	Définition.....	25
2.1.2	Epidémiologie.....	25
2.1.3	Etiologies.....	27
2.1.3.1	Prédispositions génétiques	27
2.1.3.1.1	Le syndrome de Down.....	27
2.1.3.1.2	La Familial platelet disorder/AML (FDP/AML)	28
2.1.3.1.3	Maladie de Fanconi	28
2.1.3.2	Facteurs environnementaux.....	29
2.1.3.2.1	Exposition aux radiations ionisantes	29
2.1.3.2.2	Exposition au benzène.....	29
2.1.3.2.3	Exposition aux radiations électromagnétiques	29
2.1.3.2.4	Exposition aux pesticides.....	30
2.1.3.2.5	Virus et agents infectieux	30
2.1.3.2.6	Exposition au formaldéhyde.....	30
2.1.3.2.7	Surpoids et obésité.....	30
2.1.3.2.8	Exposition in utero.....	31
2.1.3.3	Evolution de syndrome myélodysplasique/ syndrome myéloprolifératif	31
2.1.3.4	Iatrogénie	33
2.1.4	Physiopathologie	33
2.1.4.1	Bases moléculaires.....	33
2.1.4.2	Organisation clonale.....	35
2.1.5	Présentation clinique	36
2.1.6	Diagnostic biologique	37
2.1.6.1	Hémogramme.....	37
2.1.6.2	Frottis médullaire.....	37
2.1.6.3	Immunophénotypage.....	38
2.1.6.4	Génétique	40
2.1.6.4.1	Cytogénétique conventionnelle.....	40
2.1.6.4.2	Cytogénétique moléculaire.....	42
2.1.6.4.3	Biologie moléculaire	43
2.1.7	Diagnostic différentiel	47
2.1.8	Classifications.....	48
2.1.8.1	Classification Franco-Americano-Britannique (FAB)	48
2.1.8.2	Classification OMS 2008	50
2.1.8.2.1	Les LAM avec anomalies génétiques récurrentes.....	50
2.1.8.2.2	Les LAM avec signes (cytologiques et/ou génétique) évoquant une myélodysplasie.....	51
2.1.8.2.3	Les Hémopathies myéloïdes induites par des traitements cytotoxiques.....	52
2.1.8.2.4	Les LAM sans aucune particularité	52
2.1.8.2.5	Proliférations myéloïdes et trisomie 21	52
2.1.9	Facteurs pronostiques.....	53
2.1.9.1	Facteurs liés au patient	53
2.1.9.1.1	L'âge.....	53

2.1.9.1.2	Comorbidités	54
2.1.9.1.3	Le sexe	55
2.1.9.1.4	Antécédents oncologiques et hématologiques.....	55
2.1.9.2	Facteurs liés à la leucémie	56
2.1.9.2.1	Leucocytose.....	56
2.1.9.2.2	Immunophénotypage.....	57
2.1.9.2.3	Morphologie.....	57
2.1.9.2.4	Classification FAB	57
2.1.9.2.5	Cytogénétique.....	58
2.1.9.2.6	Biologie moléculaire.....	60
2.1.9.2.7	Resistance multidrogue	63
2.1.9.2.8	La maladie résiduelle	64
2.1.10	Traitement	65
2.1.10.1	Prise en charge du patient jeune	65
2.1.10.2	Prise en charge du patient âgé	66
2.1.10.3	Prise en charge en situation de rechute	66
2.1.10.4	Prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes thérapie induites	67
2.1.10.5	Le cas particulier des leucémies aiguës promyélocyaires (LAM 3).....	67
2.1.10.6	Les thérapies ciblées.....	68
2.2	Leucémies aiguës thérapie induite	69
2.3	<i>RUNX1</i>.....	72
2.3.1	Noms, localisation et structure	72
2.3.2	Rôles.....	74
2.3.3	<i>RUNX1</i> dans la leucémogénèse myéloïde	75
2.3.3.1	Translocations : effet dominant négatif.....	76
2.3.3.1.1	Translocation t(8;21)(q22;q22).....	76
2.3.3.1.2	Translocation t(3;21)(q26;q22).....	78
2.3.3.1.3	Translocation t(16;21)(q24;q22)	79
2.3.3.1.4	Translocation t(12;21)(p13;q22).....	79
2.3.3.2	Mutations : perte de fonction et haploinsuffisance.....	80
2.3.3.2.1	Mutations constitutionnelles et Familial platelet disorder	80
2.3.3.2.2	Mutations acquises.....	81
2.3.3.3	Amplification.....	82
2.3.3.4	Coopération <i>RUNX1</i> - <i>MLL</i>	82
3	Cas clinique.....	84
3.1.1	Présentation clinique	84
3.1.2	Diagnostic biologique	84
3.1.2.1	Hémogramme.....	84
3.1.2.2	Frottis médullaire	84
3.1.2.3	Immunophénotypage.....	85
3.1.2.4	Génétique	85
3.1.2.5	Reste du bilan biologique	87
3.1.3	Prise en charge.....	87
3.1.4	Suivi	88
3.1.5	Rechute.....	88
4	Objectifs.....	90

5	Matériels et méthodes	91
5.1	Chromosomes bactériens artificiels (<i>Bacterial artificial chromosome</i> ou BACs)	91
5.1.1	Objectifs	91
5.1.2	Sélection des BACs	91
5.1.3	Préparation/Réalisation	93
5.1.3.1	La culture bactérienne	93
5.1.3.2	L'extraction et purification d'ADN de BAC	93
5.1.3.3	Le marquage direct de BAC	94
5.1.4	Test	94
5.2	Amplification en chaîne par une polymérase (<i>Polymerase chain reaction</i>, PCR) et Amplification en chaîne par une transcriptase inverse (<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>, RT PCR)	96
5.2.1	Objectifs	96
5.2.2	Le choix des amorces	97
5.2.3	Réalisation test patiente	98
5.3	PCR quantitative en temps réel (Q-PCR)	99
5.3.1	Objectifs	99
5.3.2	Plaque d'efficacité	101
5.3.3	Plaque test patiente	101
5.4	Amplification rapide des extrémités d'ADNc (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>, RACE PCR)	102
5.4.1	Objectifs	102
5.4.2	Réalisation	103
5.4.2.1	RT-PCR	103
5.4.2.2	PCR du gène Abelson de contrôle	103
5.4.2.3	3'RACE amplification	103
5.4.2.4	3'RACE nichée	104
5.5	Séquençage	104
5.5.1	Objectifs	104
5.5.2	Réalisation	105
5.5.2.1	Séquençage des produits de 3'RACE PCR	105
5.5.2.2	Séquençage des produits de 3'RACE PCR semi-nichée sur gel	106
5.6	Identification du transcrit	106
6	Résultats	107
6.1	Chromosomes bactériens artificiels (BACs)	107
6.1.1	Série témoins	107
6.1.2	1 ^{ère} série	108
6.2	PCR RUNX1	108
6.3	PCR quantitative	112
6.3.1	Plaque efficacité	112
6.3.2	Plaque test patiente	112
6.4	Amplification rapide des extrémités d'ADNc (3'RACE)	114

6.4.1	PCR Abl : contrôle de la RT PCR	114
6.4.2	3'RACE amplification.....	114
6.4.3	3'RACE semi-nichée.....	115
6.5	Séquençage.....	116
6.5.1	Première réaction de séquençage	116
6.5.2	Deuxième réaction de séquençage.....	116
6.6	Identification du transcrit.....	117
7	Les longs ARNs non codant.....	119
7.1	Définition	119
7.2	Classification	119
7.2.1	LncARNs autonomes ou intergéniques	119
7.2.2	LncARNs anti-sens	120
7.2.3	Pseudogènes	120
7.2.4	LncARNs introniques	120
7.2.5	LncARNs divergents	120
7.3	Fonctions des LncARNs	121
7.3.1	LncARN et régulation de l'expression génétique.....	121
7.3.2	LncARN et hématopoïèse normale.....	122
7.3.3	LncARN et maladie.....	122
7.4	Mécanismes d'action.....	122
7.4.1	LncARN dans l'épigénétique	122
7.4.2	LncARN dans la transcription	123
7.4.3	LncARN et compartiments nucléaires	123
7.4.4	LncARN dans la régulation post-transcriptionnelle.....	124
7.4.5	Interaction longs et petits ncARNs.....	124
7.5	L'exemple de RUNXOR.....	126
8	Discussion	127
8.1	La démarche suivie.....	128
8.2	Mécanismes d'activation de RUNX1 et leucémogénèse	132
9	Conclusion.....	134
	<i>Bibliographie.....</i>	135
	<i>Annexe.....</i>	141

Table des figures

Figure 2-1 Incidence par âge en 2012-Leucémies aiguës myéloïdes (6).....	26
Figure 2-2 Survie relative estimée en 2000-2002 chez les patients avec une LAM, LAM sans anomalies cytogénétiques récurrentes, leucémie aiguë promyélocytaire (LAM3) et LAM avec dysplasie multilignée (7).....	27
Figure 2-3 Translocation t(9;22) et ses produits (42).....	31
Figure 2-4 Modèle théorique de la leucémie myéloïde (44).....	32
Figure 2-5 Protéines tyrosine kinase dans le modèle de coopération génétique de la leucémogénèse (48).....	34
Figure 2-6 Mécanismes potentiels d'interaction in vivo entre cellules souches de LAM et la niche cellulaire (53).....	36
Figure 2-7 Blastes myéloïdes contenant des « corps d'Auer ».....	38
Figure 2-8 Cartographie CD45/SSC (cluster de différenciation 45/side scatter) (55).....	39
Figure 2-9 Principe de l'analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur chromosome d'une cellule en métaphase (A) et d'une cellule interphasique ou noyau (B) (62).....	42
Figure 2-10 Schéma représentatif de l'hybridation d'une sonde marquée par une molécule fluorescente et de sa séquence d'ADN sur un chromosome (A) et schémas et images représentatives d'une sonde locus spécifique (B), d'une sonde centromérique (C) et d'une sonde de peinture chromosomique (D) (63).....	43
Figure 2-11 Délocalisation cytoplasmique de la protéine NPM1 mutée (65).....	45
Figure 2-12 Structure schématique du récepteur FLT3 (68).....	46
Figure 2-13 Mutations moléculaires dans CEBP α (71).....	47
Figure 2-14 Blastes myéloïdes de LAM2 contenant des corps d'Auer associée à une t(8;21)(q22;q22).....	49
Figure 2-15 Partenaires de MLL (74).....	51
Figure 2-16 Groupes de risque cytogénétique des patients du SWOG par catégorie d'âge (75).....	54
Figure 2-17 Courbes de survie selon l'index HCTCI (Haematopoietic cell transplantation comorbidity index) chez 177 patients atteints de LAM de plus de 77 ans traités en induction par Idarubicine et Cytarabine (78).....	55
Figure 2-18 Impact du nombre de leucocytes sur le pronostic des leucémies aiguës myéloïdes t(8;21) (77).....	56
Figure 2-19 Courbes de survie chez les patients classés selon les critères du FAB (81).....	58
Figure 2-20 Courbes de survie de Kaplan Meier selon le génotype (99).....	61
Figure 2-21 Survie globale et survie sans événement des patients avec une leucémie aiguë myéloïde selon la mutation de CEBP α (102).....	62
Figure 2-22 Graphique circulaire illustrant l'hétérogénéité moléculaire des leucémies aiguës myéloïdes à cytogénétique normale (54).....	63
Figure 2-23 Impact de MDR1 avec l'expression combinée de BAALC dans les LAM du groupe de risque intermédiaire (112).....	64
Figure 2-24 Déroulement du traitement d'induction (51).....	66
Figure 2-25 Mécanisme des topoisomérases II (118).....	70
Figure 2-26 Représentation schématique des transcrits de RUNX1 et de sa protéine (128).....	73
Figure 2-27 Formation du complexe de transcription par RUNX1/AML1 (125).....	74
Figure 2-28 Régulation des cellules hématopoïétiques et différenciation des cellules hématopoïétiques par RUNX1 (17).....	75
Figure 2-29 Représentation schématique du gène de fusion RUNX1-RUNX1T1, des protéines sauvages RUNX1T1 et RUNX1 et de la chimère de fusion RUNX1-RUNX1T1 (128).....	76
Figure 2-30 Recrutement répresseur par AML1-ETO (RUNX1/RUNX1T1) (125).....	77
Figure 2-31 Représentation schématique des gènes MDS1 et EVI1 sauvages, du gène de fusion RUNX1-MECOM/MDS1-EVI1, des protéines MECOM, EVI1 et RUNX1 sauvages et de la chimère de fusion RUNX1-MECOM (128).....	78

Figure 2-32 Représentation schématique du gène de fusion ETV6-RUNX1, des protéines sauvages ETV6 et RUNX1 et de la chimère de fusion ETV6-RUNX1 (128).....	79
Figure 2-33 Représentation schématique du cycle break-fusion-bridge (138).....	82
Figure 2-34 Modèle proposé pour le leucémogénèse avec la liaison de MLL à la partie N-terminale de RUNX1 (127).....	83
Figure 3-1 Frottis médullaire de la patiente au diagnostic	85
Figure 3-2 Caryotype sur moelle (bandesQ)	86
Figure 3-3 Hybridation in situ (FISH) sur chromosomes métaphasiques (gauche) et interphasiques (droite)	86
Figure 3-4 Analyse cytogénétique à la rechute de la patiente.....	89
Figure 5-1 Fiche fournisseur LSI RUNX1-RUNX1T1 Dual Color Dual Fusion Probes, Abbott Molecular	92
Figure 5-2 Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (144)	100
Figure 5-3 Principe de l'amplification rapide de l'extrémité 3' des ADNc (rapid amplification of cDNA ends, RACE) (142)	102
Figure 6-1 Hybridation des chromosomes bactériens artificiels (BAC) sélectionnés sur témoins sains et avec des BACs de position connue comme contrôle interne.....	107
Figure 6-2 Hybridation in situ en fluorescence avec les chromosomes bactériens artificiels sélectionnés	108
Figure 6-3 Migration des produits de RT-PCR sur gel d'agarose 2%, température d'hybridation 62°C.....	109
Figure 6-4 Migration des produits de RT-PCR sur gel d'agarose 2%, température d'hybridation 63°C.....	110
Figure 6-5 Migration des produits de RT-PCR sur gel d'agarose 2%, température d'hybridation 65°C.....	110
Figure 6-6 Migration des produits de RT-PCR sur gel d'agarose 2%, hybridation à 64°C.....	111
Figure 6-7 Courbes d'amplification plaque d'efficacité ensemble des amorces.....	112
Figure 6-8 Quantification relative de l'expression de RUNX1 par Q-PCR SYBR® Green	113
Figure 6-9 Migration des produits de la PCR Abl sur gel d'agarose 2%.....	114
Figure 6-10 Migration des produits de la 3'RACE sur gel d'agarose 2%	114
Figure 6-11 Migration des produits de 3'RACE PCR semi-nichée sur gel d'agarose 2%.....	115
Figure 6-12 Migration des produits de la 3'RACE PCR semi-nichée sur gel d'agarose haute résolution à 2%.....	116
Figure 6-13 Electrophorégramme du produit de la 3'RACE PCR semi-nichée de la patiente (65°C).....	117
Figure 6-14 Séquence du produit de la 3'RACE PCR semi-nichée de la patiente (65°C).....	117
Figure 6-15 Alignement de séquence d'après la base de données Ensembl.....	118
Figure 6-16 Identification du partenaire de RUNX1 dans la translocation t(8;21)(q22;q22) atypique : RP11-731N10.1, d'après la base de donnée Ensembl.....	118
Figure 7-1 Contexte génomique de lncARNs (147)	121
Figure 7-2 Mécanisme de fonction des lncARN (147).....	125
Figure 8-1 RP11-731N10.1, séquence du transcrit et structure secondaire d'après (http://genome.igib.res.in/lncRNome).....	127
Figure 8-2 Stratégie schématique de la panhandle PCR (155)	131

Table des tableaux

<i>Tableau 2-1 Facteurs de risques associés aux leucémies aiguës myéloïdes (8)</i>	27
<i>Tableau 2-2 Agents cytotoxiques impliqués dans les leucémies aiguës thérapies induites d'après (13)</i>	33
<i>Tableau 2-3 Classification des Leucémies aiguës myéloïdes de l'OMS 2008 (51)</i>	50
<i>Tableau 2-4 Mortalité dans les 30 premiers suivant l'initiation du traitement d'induction (75)</i>	54
<i>Tableau 2-5 Corrélation entre groupes de risque cytogénétique et caractères dysplasiques selon le WHO (81)</i>	57
<i>Tableau 2-6 Variation des groupes de risque cytogénétique selon les groupes d'essais cliniques (92)</i>	59
<i>Tableau 2-7 Révision de la classification pronostic en analyse multivariée (73)</i>	59
<i>Tableau 2-8 European LeukemiaNet. Corrélation entre les données cytogénétiques et moléculaires dans les leucémies aiguës myéloïdes avec données cliniques (94)</i>	60
<i>Tableau 2-9 Score pronostic à la première rechute (51)</i>	67
<i>Tableau 2-10 Caractéristiques biologiques et cliniques des cas de t-LAM associées aux agents alkylants et aux inhibiteurs de topoisomérases II (118)</i>	69
<i>Tableau 2-11 Altérations fonctionnelles des mutants RUNX1 (127)</i>	81
<i>Tableau 5-1 Chromosomes bactériens artificiels sélectionnés</i>	92
<i>Tableau 5-2 Chromosomes bactériens artificiels témoins</i>	94
<i>Tableau 5-3 Combinaisons d'hybridation des BACs</i>	95
<i>Tableau 5-4 Amorces sélectionnées</i>	98
<i>Tableau 8-1 Publications avec recherche de partenaires inconnus dans des translocations atypiques impliquant RUNX1 (149–152)</i>	128

Listes des abréviations et acronymes

3'RACE PCR : Rapid amplification of cDNA ends	FISH : <i>fluorescence in situ hybridation</i>	OMS : organisation mondiale de la santé (WHO : <i>world health organization</i>)
ABL : gène Abelson	FLT3 : <i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>	p300 : histone acétyltransférase <i>E1A binding protein p300</i>
ADN : acide désoxyribonucléique, ADNc : ADN complémentaire	GM-CSF : <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>	pb : paire de bases
ARN : acide ribonucléique, ARNm : ARN messenger, miARN : micro-ARN	HCTCI : haematopoietic cell transplantation comorbidity index	PCR2 : <i>polycomb repressive complex 2</i>
BAC : chromosome bactérien artificiel	HDAC : histone déacétylase	Ph1 : Chromosome Philadelphie
BCR : <i>breakpoint cluster region</i>	HLA : human leukocyte antigene	Q-PCR : <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
BMI : <i>body mass index</i>	IC : intervalle de confiance	R3C : <i>RNA-guided Chromatin Conformation Capture</i>
CALGB : cancer and leukemia group B	IL-3 : interleukine 3	RHD : Runt homology domain
CEBP α : <i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>	ISCN : international systeme for human cytogenetic nomenclature	Rpm : révolution par minutes
CBF : <i>core binding factor</i>	kb : kilobase	RT-PCR : <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
CD : cluster de différenciation	LAM : leucémie aiguë myéloïde	<i>RUNX1 : runt-related protein 1</i>
CGH : hybridation génomique comparative	LAL : leucémie aiguë lymphoïde	t-LA : leucémie aiguë thérapie induite
CMF : cytométrie en flux	LMC : leucémie myéloïde chronique	t-SMD : syndrome myélodysplasique thérapie induit
Ct : <i>cycle threshold</i> (cycle seuil)	lncARN : long ARN non codant intergénique	Taq polymérase : <i>thermus aquaticus</i> polymérase
dNTP : appellation désignant le mélange des 4 désoxyribonuléotides	MLL : <i>myeloid lineage leukemia</i>	TLS : <i>translocated in liposarcoma</i>
DSB : <i>DNA double strand break</i>	MPO : myéloperoxydase	TMR : <i>treatment-related mortality</i>
EDTA : éthylène diamine tétra acétique	MRC : <i>medical research council</i>	Top2 : ADN topoisomérase II
ELN : <i>european leukemia net</i>	MRD : <i>multidrug resistance</i>	SWOG : southwest oncology group
FAB : Classification <i>French-American-British</i>	NGS : <i>next generation sequencing</i>	
FDP : <i>familial platelet disorders</i>	NHR : nervy homology region	
	NPM1 : nucléophosmine ou <i>nucleolar phosphoprotein B23</i>	

1 Introduction

Les leucémies aiguës de l'adulte constituent un groupe hétérogène d'hémopathies issues de la transformation oncogénique des progéniteurs hématopoïétiques. Le dialogue clinico-biologique est essentiel au diagnostic. Ce dernier fait appel à plusieurs disciplines de la biologie médicale, en combinant des examens cytologiques, cytogénétiques, immunophénotypiques et moléculaires. Les progrès des sciences et des techniques ont permis l'essor de la cytogénétique avec la mise en évidence d'anomalies chromosomiques récurrentes. Ces dernières, à l'aide de modèles cellulaires et animaux ont permis l'amélioration des connaissances de la leucémogénèse. Rapidement, certaines anomalies cytogénétiques ont été associées à une réponse thérapeutique différente. Elles ont contribué à l'élaboration d'essais cliniques en incluant et stratifiant les patients en fonction de leurs données biologiques et de leur survie. C'est la base de la création d'une classification internationale fondée sur des critères morphologiques, génétiques et pronostiques : la classification OMS (organisation mondiale de la santé). De la même manière, la prise en charge des leucémies aiguës s'est homogénéisée par le biais de protocoles standardisés. Désormais, le décryptage génétique et épigénétique des leucémies aiguës ont mis en exergue des marqueurs moléculaires piliers de la cancérogénèse. Ces marqueurs sont soit sensibles à des thérapies ciblées laissant entrevoir des avancées diagnostiques et thérapeutiques, soit des éléments reflétant une progression particulière de la maladie, identifiant un sous-groupe de maladie particulier.

Ce travail, s'articule autour d'un cas clinique de leucémie aiguë myéloïde (LAM) diagnostiqué et suivi au centre hospitalo-universitaire de Nancy. L'atypie cytogénétique et moléculaire de ce cas a été l'occasion de mettre à profit les différentes technologies disponibles au laboratoire de génétique du CHU afin de rechercher et d'identifier le gène partenaire dans une translocation impliquant le gène RUNX1.

Tout d'abord, un état des connaissances actuelles concernant les leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte est nécessaire. Un focus sur le gène RUNX1 décrivant son rôle et son implication majeure dans la leucémogénèse des LAM argumente notre intérêt pour ce cas. Ensuite, les techniques cytogénétiques et moléculaires seront abordées conformément à la réflexion et à la démarche de diagnostic génétique. Après l'exposition des résultats obtenus, une mise au point des connaissances sur les longs ARNs non codant qui « révolutionnent » les mécanismes connus de la cancérogénèse sera faite. Enfin, une discussion poursuivra le raisonnement scientifique.

2 Notions générales

2.1 Leucémies aiguës myéloïdes

2.1.1 Définition

Leukämie est un mot allemand dérivé de *leukos* qui signifie en grec « blanc » et de *aima* qui se traduit par « sang ». Ce terme fut introduit pour la première fois dans le vocabulaire médical en 1847 dans l'article de Rudolf Virchow (1). Ce nom traduit par « leukémie » puis « leucémie » en France en 1856, donna l'appellation ainsi consacrée à cette nouvelle maladie (2). Cette affection, déjà signalée depuis plusieurs années (1844-1845) parallèlement décrite en Allemagne par Rudolf Virchow et en Angleterre par John Hughes Bennett, se définissait comme un syndrome mortel associant hépato-splénomégalie et adénopathies avec un excès de globules blancs dans le sang lui donnant un aspect grisâtre. Ainsi, R. Virchow, J. Bennett et le physicien-microscopiste français A. Donné furent les premiers à présenter la leucémie comme une pathologie indépendante de l'inflammation. Plus tard, en 1868, E. Neumann établit le lien entre la moelle osseuse et la formation des cellules sanguines (hématopoïèse), définissant la leucémie comme une maladie de la moelle osseuse (1).

Aujourd'hui les leucémies aiguës sont des maladies dites malignes et clonales touchant les progéniteurs hématopoïétiques. Cet ensemble d'hémopathies se caractérise par l'inhibition de la différenciation des progéniteurs des cellules sanguines appelées communément « blastes ». Les cellules bloquées à des stades différents de maturation s'accumulent et diffusent dans le sang. La production de cellules hématopoïétiques efficaces est réduite puis à terme devient inexistante. On distingue deux grands types de leucémies en fonction de l'origine du précurseur hématopoïétique atteint :

- la leucémie aiguë myéloïde qui entraîne une expansion clonale (toutes les cellules filles conservent les mêmes caractéristiques) d'un précurseur granuleux myéloïde, les « myéloblastes »
- la leucémie aiguë lymphoïde avec atteinte de la lignée lymphoïde et prolifération de « lymphoblastes ».

2.1.2 Epidémiologie

Les LAM sont des affections rares si on se réfère à la définition du groupe RAREcare (<6/100000/an) (3). Elles représentent 1% des cancers en France et 80% des leucémies

aiguës de l'adulte (4). Le nombre de nouveaux cas en France en 2012 est estimé à 2791. Cette incidence est superposable à celle observée en Europe (5). Le taux d'incidence standardisé sur la population mondiale est de 2,6 pour 100000 chez l'homme et de 2,3 pour 100000 chez la femme, soit un rapport homme/femme de 1,1 (6).

Les LAM sont des pathologies du sujet âgé avec un âge médian de survenue de 71 ans. En effet, si l'incidence est relativement basse chez les sujets de moins de 40 ans, elle augmente considérablement chez les plus de 60 ans (figure 2-1). L'incidence atteint 30/100000 chez l'homme et 19/100000 chez la femme chez les plus de 85 ans.

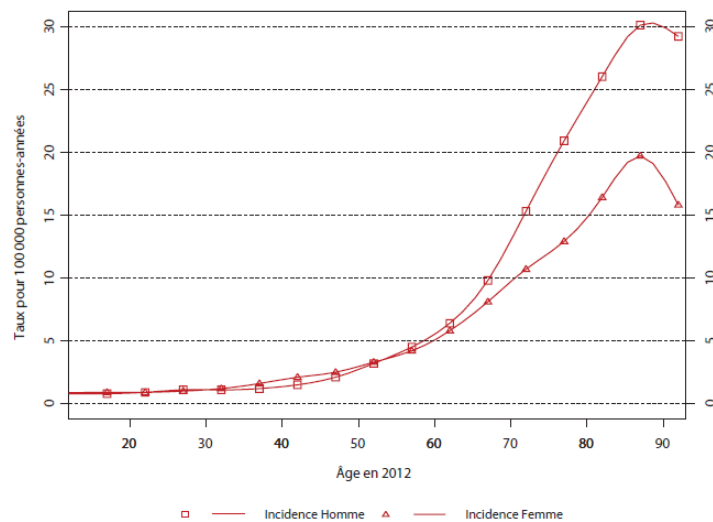


Figure 2-1 Incidence par âge en 2012-Leucémies aiguës myéloïdes (6)

Les LAM sont des pathologies qui progressent. On observe un doublement du nombre de cas entre 1980 et 2012 soit de 533 à 1381 nouveaux cas chez l'homme et de 571 à 1410 pour les femmes. Sur cette période le taux moyen d'évolution de l'incidence est : chez l'homme de +1,5% avec une inversion de tendance à -1% sur la période de 2005 à 2012, chez la femme de +1,4% et un ralentissement récent à +1,1%.

Ces hémopathies restent de mauvais pronostic avec une survie relative à 5 ans qui ne dépasse pas 20% (figure 2-2) (7).

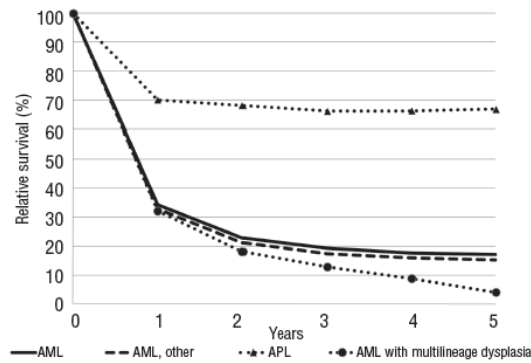


Figure 2-2 Survie relative estimée en 2000-2002 chez les patients avec une LAM, LAM sans anomalies cytogénétiques récurrentes, leucémie aiguë promyélocytaire (LAM3) et LAM avec dysplasie multilignée (7)

2.1.3 Etiologies

Dans la plupart des cas les LAM n'ont pas de cause ou de facteur déclenchant connu et la maladie survient chez des personnes en apparence jusque-là en bonne santé. Ce sont les leucémies « de novo ». Néanmoins, il arrive que les LAM soient associées à un contexte étiologique (tableau 2-1).

Tableau 2-1 Facteurs de risques associés aux leucémies aiguës myéloïdes (8)

Genetic disorders	Down syndrome Klinefelter syndrome Patau syndrome Ataxia telangiectasia Shwachman syndrome Kostman syndrome Neurofibromatosis Fanconi anemia Li-Fraumeni syndrome
Physical and chemical exposures	Benzene Drugs such as pipobroman Pesticides Cigarette smoking Embalming fluids Herbicides
Radiation exposure	Nontherapeutic, therapeutic radiation
Chemotherapy	Alkylating agents Topoisomerase-II inhibitors Anthracyclines Taxanes

2.1.3.1 Prédispositions génétiques

Certains facteurs de prédisposition génétiques sont reconnus. Des pathologies héréditaires sont associées à un risque accru de leucémie aiguë (8–10).

2.1.3.1.1 Le syndrome de Down

Le syndrome de Down ou trisomie 21 constitutionnelle est caractérisé cliniquement par une dysmorphie faciale accompagnée d'anomalies congénitales comme le retard mental, les

malformations cardiaques ou des déficits immunitaires. Il a été observé que les enfants atteints avaient un risque multiplié par 10-20 voire 100 de développer une leucémie aiguë myéloïde (11–13). La LAM du syndrome de Down apparaît avant l'âge de 5 ans et est souvent précédée d'un syndrome myéloprolifératif transitoire. L'une des caractéristiques de ces leucémies est la présence récurrente de mutation somatique du gène *GATA1*, gène fortement impliqué dans la différenciation érythro-mégacaryocytaire. Il est à noter également que des mutations germinales de *GATA1* en dehors du syndrome de Down génèrent une dysfonction plaquettaire, une thrombopénie et une anémie de transmission liée à l'X.

2.1.3.1.2 ***La Familial platelet disorder/AML (FDP/AML)***

C'est une maladie autosomique dominante rare causée par une mutation germinale du gène *RUNX1* (14). Ce désordre héréditaire est associé à une prédisposition aux hémopathies dont les LAM (15). Vingt à soixante pourcent des patients développent vers leur troisième décennie un syndrome myélodysplasique ou une leucémie aiguë (16). A ce jour, environ une trentaine de familles atteintes ont été rapportées (17). La clinique est marquée par des hémorragies cutanéomuqueuses. Biologiquement, les patients présentent une dysmégacaryopoïèse, une thrombopénie et une dysfonction plaquettaire. La plupart des mutations sont situées dans le domaine très conservé Runt ou RHD (runt homology domain) du gène *RUNX1* bien que des mutations aient été retrouvées dans la région C terminale. L'haplo-insuffisance est à l'origine de la prédisposition leucémique (18).

2.1.3.1.3 ***Maladie de Fanconi***

De même, d'autres désordres génétiques affectant les mécanismes de réparation de l'ADN sont associés à certains cas de LAM pédiatriques. Par exemple, la maladie de Fanconi, de transmission autosomique récessive (sauf pour *FANCB* dont la transmission est liée à l'X) est caractérisée par une instabilité chromosomique avec une hypersensibilité spécifique aux agents pontant de l'ADN. Malgré une grande variabilité phénotypique l'atteinte hématologique prédomine et le risque pour un enfant malade de développer une leucémie aiguë myéloïde est environ 500 fois supérieur à celui de la population générale (19).

Par ailleurs, d'autres maladies héréditaires sont associées à un risque de développer une LAM comme le syndrome de Klinefelter, le syndrome de Li Fraumeni (20) et la neurofibromatose (8,10).

2.1.3.2 Facteurs environnementaux

L'hétérogénéité des LAM laisse supposer des mécanismes causals différents. Il y aurait donc un lien fonctionnel entre les anomalies moléculaires ou mutations et le facteur étiologique (8,21). La leucémogénèse est un processus multi étapes qui dépend, entre autres, de la susceptibilité du progéniteur hématopoïétique face aux agents inducteurs. Ainsi, certains facteurs de risques environnementaux sont reconnus.

2.1.3.2.1 Exposition aux radiations ionisantes

L'association entre les radiations ionisantes et la leucémie fut reconnue dès le début du 20^{ème} siècle. D'après Nakanishi et al (22), on observe chez les survivants d'attaque par bombe atomique un haut risque de LAM. De même, la LAM apparaît aussi plus fréquente en industrie nucléaire (23). Encore, le personnel des compagnies aériennes par l'intensité des hauts trajets aériens semble avoir une incidence plus élevée de LAM que la population naviguant moins de 5000 heures (24).

2.1.3.2.2 Exposition au benzène

C'est le deuxième facteur de risque le plus documenté (25). La cigarette est la source d'exposition au benzène la plus commune. Khane et al (26) trouve une association entre LAM et tabac. Le risque est de 1,2 à 2,3 fois plus élevé chez les fumeurs, surtout lorsque le tabagisme est supérieur à 10 ans. Il a été observé in vitro une association significative entre lésions génétiques et leucémies induites chez les travailleurs exposés au benzène (27). Les plastiques, résines, peintures et gaz d'échappement automobiles sont aussi de potentiels exposants professionnels. Une récente étude chinoise (28) a cherché à identifier les altérations génétiques impliquées dans la pathogénèse de la leucémie chez des travailleurs exposés au benzène ne présentant pas de signe clinique de leucémie. Cette équipe a mis en évidence par hybridation génomique comparative (CGH-array) des variations du nombre de copies (*copy-number variations*, CNVs) sur plusieurs chromosomes. L'analyse fonctionnelle des gènes des chromosomes altérés montre une surexpression de *BSG* et *NOTCH1* chez les personnes exposées. Ces gènes sont impliqués dans le développement leucémique. Cette modification d'expression génique est proposée comme potentiel bio-marqueur pour évaluer le risque de leucémie après exposition au benzène.

2.1.3.2.3 Exposition aux radiations électromagnétiques

L'étude de Minder et al (29) met en évidence un lien de cause à effet entre exposition intense aux basses fréquences électromagnétiques et leucémie. Plus tard, la même équipe

suisse poursuit l'étude sur une cohorte de 20 141 employés des chemins de fer suisse entre 1972 et 2002 (30). Un risque relatif de 4.74 (IC à 95% : 1.04 à 21.60) de leucémie chez les conducteurs de train est observé. Comparé aux directeurs de gare, les conducteurs de train ont un risque relatif de 1.43 (IC à 95% : 0.74 à 2.77) de mortalité par leucémie. L'étude démontre donc une association dose dépendante entre leucémie et exposition aux ondes électromagnétiques basses fréquences.

2.1.3.2.4 Exposition aux pesticides

De nombreuses études ont été menées pour évaluer l'effet toxique des différentes classes de pesticides (25,31). Certaines ont rapportées une augmentation significative du risque d'hémopathie chez les agriculteurs exposés aux herbicides, pesticides contenant de l'arsenic, atrazine, lindane, dichloro diphényle trichloro-éthane (DDT) et même les pesticides organophosphorés (32–34).

2.1.3.2.5 Virus et agents infectieux

Il a été prouvé sur des modèles animaux que certains rétrovirus pouvaient causer des néoplasies, notamment des leucémies. Mais, à ce jour, aucun lien clair de causalité n'a été identifié entre rétrovirus et LAM (8). Néanmoins, le Parvovirus B19 pourrait jouer un rôle dans la pathogénie de la LAM (35). Des études ont recherché l'existence d'un risque associé à l'activité de différents groupes travaillant à la ferme ou dans la production alimentaire (25). Une augmentation significative du risque a été démontrée chez les éleveurs de bétails et dans les professions reliées à la production de viande animale (36,37).

2.1.3.2.6 Exposition au formaldéhyde

Il y a une association dose dépendante entre l'exposition au formaldéhyde et la mortalité par LAM chez les embaumeurs (38). Il a aussi été montré que la toxicité in vitro au formaldéhyde est identique aux lésions génétiques retrouvées dans la lignée myéloïde chez les travailleurs exposés à ce fixateur (39).

2.1.3.2.7 Surpoids et obésité

La méta-analyse de S.Larsson et A.Wolk (40) met en évidence l'excès de poids comme potentiel facteur de risque de leucémie. L'analyse de l'ensemble des résultats comparée aux personnes ayant un BMI <25 kg/m² indique que le surpoids (BMI : 25-30 kg/m²) et l'obésité (BMI > 30 kg/m²) ont un risque relatif de leucémie de 1.14 (IC à 95% : 1.03-1.25) et 1.39 (IC à 95% : 1.25-1.54). En revanche, le mécanisme biologique reliant obésité et leucémie reste imprécis. Les taux élevés d'insuline et de IGF-1 associés pourraient promouvoir la

tumorigénèse. La dysfonction immunitaire et l'inflammation chronique dues au surpoids sont aussi des hypothèses à explorer.

2.1.3.2.8 *Exposition in utero*

Une revue épidémiologique récente des LAM de l'enfant (41) a démontré un effet notable de l'âge maternel, du poids de naissance, des fausses couches antérieures, de l'ordre de naissance, de l'exposition maternel aux pesticides et de la consommation maternel d'alcool pendant la grossesse. Mais la difficulté de mesurer les diverses expositions maternelles rend les études peu puissantes.

2.1.3.3 *Evolution de syndrome myélodysplasique/ syndrome myéloprolifératif*

Les LAM peuvent compliquer l'évolution d'autres hémopathies comme les syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs par acutisation. La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif caractérisé par la prolifération de la lignée granuleuse. Cette hémopathie est associée à une anomalie cytogénétique spécifique, la translocation $t(9;22)(q34;q11)$ donnant le chromosome Philadelphie (Ph1). Au niveau moléculaire cette translocation entraîne la fusion du gène *ABL1* du chromosome 9 et du gène *BCR* sur le chromosome 22. Ainsi, l'extrémité 5' de *BCR* se juxtapose à la portion 3' de *ABL* sur un chromosome 22 plus court, créant le transcrite de fusion BCR-ABL1 (figure 2-3). L'activité tyrosine kinase de ABL se retrouve activée constitutivement. L'acquisition du transcrite BCR-ABL1 dans une cellule souche pluripotente est considérée comme l'étape initiale donnant un avantage prolifératif (42).

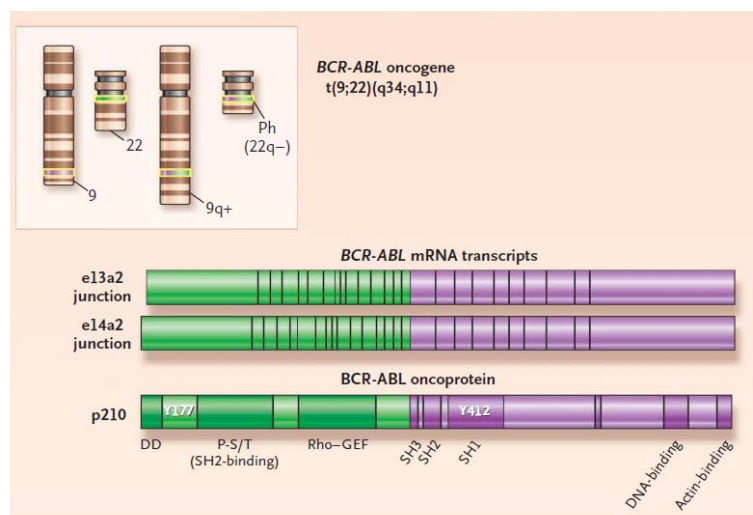


Figure 2-3 Translocation $t(9;22)$ et ses produits (42)

L'oncogène BCR-ABL sur le chromosome Philadelphie et son réciproque ABL-BCR sur le chromosome dérivé 9q+ (42) Dans la LMC classique, BCR-ABL est transcrit en ARN messager avec les jonctions e13a2 ou e14a2, lesquelles sont traduites en protéine p210 BCR-ABL. Cette oncoprotéine hybride contient des domaines fonctionnels en N-terminal de BCR :

dimérisation (DD), SRC-homologie 2 (SH2) et le Rho GTP-GDP facteur d'échange (GEF) et la portion C-terminale de ABL. La tyrosine 177 (Y177) dans la portion BCR du gène de fusion et la tyrosine 412 (Y412) dans ABL sont importantes pour l'amarrage des protéines et pour l'auto-phosphorylation. P-S/T : phosphosérine et phosphothréonine

Classiquement, la LMC évolue en 3 phases : chronique, accélérée et blastique dans un délai de 3 à 8 ans (figure 2-4). L'agressivité et la cinétique de la phase chronique varie entre les patients (42). Le passage en phase blastique se manifeste cliniquement par des sueurs nocturnes, une perte de poids, des douleurs osseuses, une anémie et un syndrome infectieux. Au niveau biologique, il y a une augmentation du nombre de blastes, le plus souvent >30% en périphérique ou dans la moelle (>20% selon l'OMS 2008) avec un syndrome tumoral extra médullaire. Les blastes sont de morphologie similaire aux blastes des leucémies aiguës. Dans 60-80% ils sont de différenciation myéloïde et 20 à 30% sont lymphoïdes (43). Les mécanismes de progression vers la phase blastique sont mal connus. Cependant, plusieurs hypothèses physiopathologiques sont reconnues (43,44):

- l'augmentation de l'expression de BCR-ABL1, plus élevée en phase blastique qu'en phase accélérée
- l'arrêt de la différenciation via la répression du gène *CEBP α*
- l'instabilité génomique et défaut de réparation de l'ADN dus au stress oxydatif chronique induit par BCR-ABL1
- l'acquisition d'anomalies chromosomiques, consécutive à l'hypothèse précédente. Les plus fréquentes sont la trisomie 8 (34%), isochromosome 17 (20%) et la duplication du chromosome Ph1 (38%)
- l'inactivation de gène suppresseur de tumeur, le plus commun étant *TP53* qui est muté dans 25 à 30% des cas de phase blastique myéloïde.

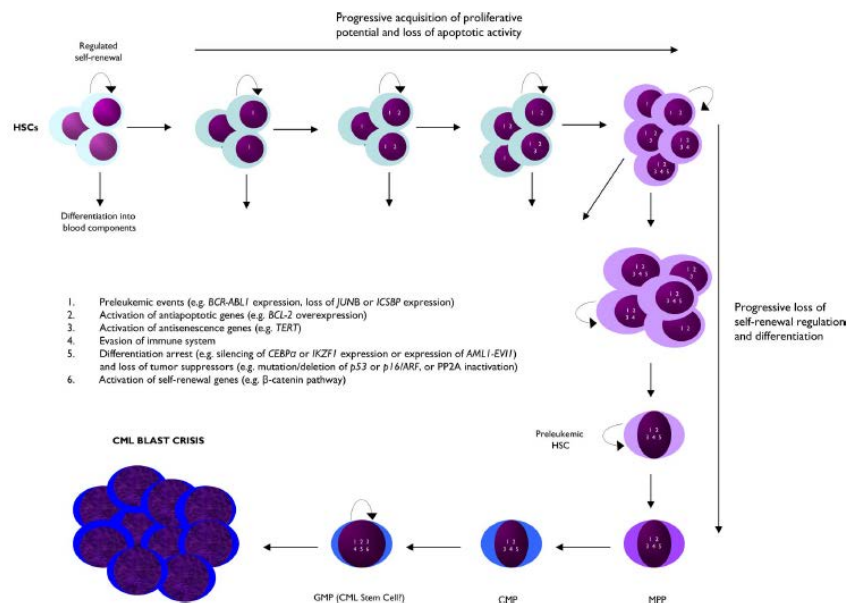


Figure 2-4 Modèle théorique de la leucémie myéloïde (44)

2.1.3.4 Iatrogénie

Enfin, les LAM peuvent être secondaires aux thérapies anti cancéreuses (tableau 2-2). Dix à vingt pourcent des LAM apparaissent après le traitement d'un cancer par chimiothérapie (13). Introduite vers la fin des années 1940, les chimiothérapies anti-cancéreuses sont rapidement (dès 1960) associées à un potentiel pouvoir cancérigène. En 1970, un premier rapport incrimine les agents alkylants tandis qu'un second en 1987 implique les inhibiteurs de topoisomérase II (45).

Tableau 2-2 Agents cytotoxiques impliqués dans les leucémies aiguës thérapies induites d'après (13)

Agents alkylants	Melphalan, cyclophosphamide, chlorambucil, busulfan, carboplatine, cisplatine, dacarbazine, procarbazine, carmustine, mitocine C, thiotepa, momustine, moutarde azotée, etc
Inhibiteurs des topoisomérase II	Etoposide, teniposide, doxorubicine, daunorubicine, mitoxantrone, amsacrine, actinomycine
Autres	Antimétabolites: thiopurines, mycophénolate, fludarabine Agents anti-tubuline: vincristine, vinblastine, vindesine, paclitaxel, docetaxel

2.1.4 Physiopathologie

2.1.4.1 Bases moléculaires

Une cellule souche hématopoïétique normale ou un progéniteur déjà engagé dans la différenciation acquièrent un phénotype leucémique par l'addition d'au moins deux événements oncogéniques (46). L'équipe de G. Gilliland (23,47), suggère un concept multi-étapes de la leucémogénèse des LAM en s'appuyant sur trois arguments. Tout d'abord, l'étude des modèles murins indique que la mutation d'un seul gène n'est pas suffisante pour provoquer une leucémie myéloïde. Deuxièmement, les rares syndromes leucémiques héréditaires prouvent que différentes mutations sont nécessaires à la pathogénèse leucémique. Le syndrome autosomique dominant FDP en est l'exemple. Malgré la présence de la mutation germinale du gène *RUNX1* dès la naissance, la maladie ne se développe qu'à l'âge adulte avec l'acquisition d'autres anomalies caryotypiques et moléculaires. Enfin, l'analyse des mutations des LAM sporadiques montre que la plupart des patients associent anomalies cytogénétiques et moléculaires (figure2-5).

Deux groupes d'altérations ont été définis sur la base d'analyses fonctionnelles :

- **Les mutations de classe I** touchant des gènes impliqués dans les voies de signalisation intracellulaires donnent à la cellule un avantage prolifératif et/ou de survie. Il y a une

activation constitutive des gènes codant pour des protéines récepteurs à activité tyrosine kinase (PTK) soit par oligomérisation du domaine due à la fusion N-terminale avec une autre protéine, soit par mutation activatrice dans le domaine kinase ou répétitions internes en tandem dans le domaine juxta-membranaire (*FLT3*, *KIT*) (47,48). Les autres mutations de classe I concernent les isoformes de la voie KRAS/PTPN11. A noter, que les mutations RAS et PTK semblent être mutuellement exclusives (48). Ces types de mutations induisent donc l'activation constitutive de cascades de signalisation intracellulaires aboutissant à la prolifération incontrôlée et/ou à la résistance à l'apoptose.

- **Les altérations de classe II** entraînent une perte de fonction de facteurs de transcription au travers de formation de transcrits de fusion via des translocations chromosomiques (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, *PML-RARα*, *MLL...*) ou des mutations ponctuelles (*RUNX1*, *CBFβ*, *MLL*,...). La répression de la transcription des gènes gouvernant la différenciation bloque le processus de différenciation myéloïde.

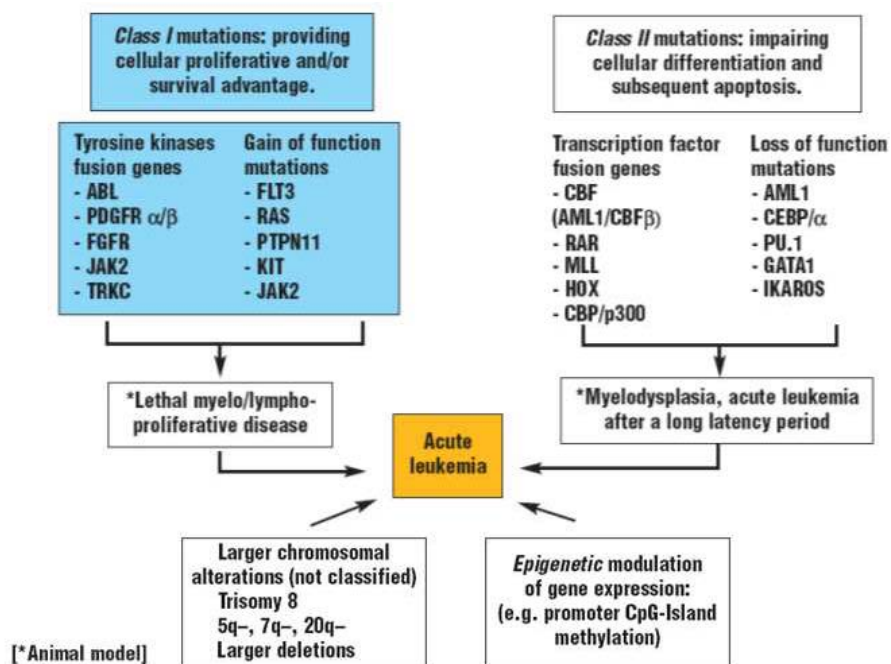


Figure 2-5 Protéines tyrosine kinase dans le modèle de coopération génétique de la leucémogénèse (48)

Des arguments montrent que les deux classes de mutations coopèrent au développement de la leucémie. Par exemple, les leucémies myéloïdes chroniques tyrosine kinase mutées en transformation acquièrent des mutations de classes II pendant la transition vers la crise blastique (49). De même, les mutations de *FLT3* sont fréquemment retrouvées a posteriori au sein des LAM présentant des transcrits de fusion comme *PML-RARα* ou *CBFβ-MYH11*. Plus

récemment, une troisième classe de mutation a été ajoutée à ce modèle. Il concerne des gènes impliqués dans les modifications épigénétiques touchant l'ADN ou les histones. Les plus décrits sont : *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* et *EZH2* mais les mécanismes précis de contribution au phénotype leucémique ne sont pas encore bien compris (50). L'altération des enzymes isocitrate déshydrogénases (*IDH1* et *IDH2*) entraînerait un dérèglement du métabolisme cellulaire de la méthylation de l'ADN et pourrait avoir un rôle dans la leucémogénèse (51). Néanmoins, d'autres caractéristiques des processus cancéreux sont à prendre en compte comme l'échappement à la réponse immune, la biologie des cellules souches et leurs relations avec le microenvironnement au sein de la niche hématopoïétique (51).

2.1.4.2 Organisation clonale

Le clone leucémique est schématiquement organisé en trois compartiments distincts (51) :

- un contingent minoritaire de cellules souches quiescentes conservant la capacité d'auto-renouvellement ou d'engagement dans le processus de prolifération/maturation. La « niche cellulaire » est le compartiment anatomique où résident les cellules souches hématopoïétiques. Le devenir de ces dernières dépend de différents stimuli et interactions entre cellules, matrice et signaux moléculaires. Le microenvironnement de la niche cellulaire régule l'hématopoïèse normale mais des perturbations en son sein contribuent à l'apparition d'hémopathies (figure 2-6). La moelle osseuse avec les ostéoblastes et des vaisseaux sanguins constituent la niche des cellules souches hématopoïétiques (52,53).
- un groupe de progéniteurs leucémiques plus matures ne se renouvelant pas mais hautement proliférant avec des propriétés clonogènes.
- une part majoritaire de « blastes » leucémiques ayant des capacités de différenciation limitées, retrouvée en grande majorité dans le sang et la moelle osseuse. Cet effectif de cellules détermine la classification morphologique des LAM (FAB).

L'hématopoïèse leucémique provoque une inhibition de l'hématopoïèse normale par des mécanismes mal connus conduisant à un état d'insuffisance médullaire majeure.

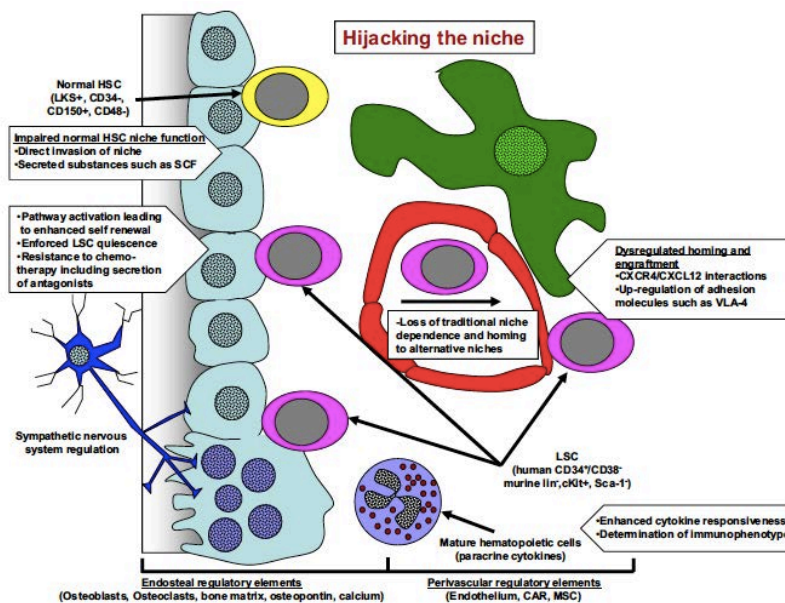


Figure 2-6 Mécanismes potentiels d'interaction in vivo entre cellules souches de LAM et la niche cellulaire (53)

2.1.5 Présentation clinique

La présentation clinique est variable. L'entrée dans la maladie peut être peu symptomatique (bilan d'une asthénie) ou, au contraire, se présenter en tableau d'urgence vitale (hémorragies) nécessitant une prise en charge en milieu spécialisée. Il n'y a pas de signes cliniques caractéristiques mais ils résultent directement des conséquences de la maladie : l'insuffisance médullaire et le syndrome tumoral dû à l'envahissement par les cellules blastiques (51).

L'insuffisance médullaire atteint à des degrés différents les trois lignées cellulaires et peut se traduire par :

- un syndrome anémique d'installation rapide associant asthénie, pâleur, dyspnée et tachycardie.
- un syndrome infectieux en rapport avec la neutropénie se manifestant par de la fièvre. Les points d'appel cliniques sont classiquement une pneumopathie, une angine ou une infection des tissus mous.
- un syndrome hémorragique cutané (pétéchies, hématomes) ou muqueux (gingivorragies, épistaxis) en conséquence de la thrombopénie. Elle peut se compliquer par une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

Le syndrome tumoral implique une hypertrophie des organes hématopoïétiques (hépatosplénomégalie et adénopathies) mais peut s'accompagner de localisations extra médullaires selon le type de LAM. Ainsi, une hypertrophie gingivale est très évocatrice d'une LAM à composante monocyttaire. Des infiltrations cutanées nodulaires dites « leucémides » et des

tumeurs localisées de type de sarcome granulocyttaire sont possibles. Enfin, les localisations du système nerveux central sont rares et sont plutôt vues dans les leucémies aigues lymphoblastiques (LAL).

Les critères cliniques qui définissent l'urgence diagnostique et thérapeutique sont le syndrome de leucostase pulmonaire et/ou cérébrale avec une hyperleucocytose supérieure à 50 G/L, la coagulation intravasculaire disséminée, les troubles métaboliques du syndrome de lyse cellulaire (hyperkaliémie, hyperuricémie, hyperphosphatémie, LDH augmentés, hypocalcémie) et le syndrome fébrile imposant la mise en place d'une antibiothérapie à large spectre (51).

2.1.6 Diagnostic biologique

Le diagnostic repose sur la démonstration de l'accumulation de blastes due à un excès de prolifération et au blocage de la différenciation. La prise en charge initiale, pluridisciplinaire demande un bilan sophistiqué afin d'obtenir un diagnostic précis fondamental pour établir le schéma thérapeutique le plus adapté.

2.1.6.1 Hémogramme

L'hémogramme est le premier examen d'orientation du diagnostic. Il est réalisé à partir d'un prélèvement de sang périphérique sur tube EDTA (éthylène diamine tétra acétique). La numération formule sanguine est toujours anormale avec au premier plan une anémie normocytaire, normochrome, arégénérative. Une thrombopénie parfois sévère est fréquemment observée. La leucocytose est variable allant de la leucopénie (<3 G/L) avec agranulocytose (<0,5 G/L) à l'hyperleucocytose majeure (>100 G/L). Les blastes circulants peuvent constituer l'essentiel du compte leucocytaire dans les formes hyperleucocytaires mais sont rares ou absents dans les formes leucopéniques. La morphologie des blastes variant d'une leucémie à une autre, leur description au stade du frottis sanguin permet d'orienter le diagnostic cytologique.

2.1.6.2 Frottis médullaire

Le myélogramme est systématique et permet de faire l'examen cytologique de la moelle osseuse. Il permet d'affirmer le diagnostic et de classer la leucémie. Il doit être effectué avant tout traitement. Les frottis médullaires sont obtenus à partir d'une ponction de moelle osseuse au niveau du sternum ou des ailes iliaques postérieures du patient après étalement au lit du malade et coloration au May-Grünwald-Giemsa. Il est recommandé de compter 500 cellules. Le plus souvent la moelle est hypercellulaire (54). Les lignées mégacaryocytaires et érythroblastiques sont réduites (sauf dans les LAM 6 érythroblastique et LAM 7

mégacaryoblastique). Des dysmorphies cellulaires variables sont possibles. La leucémie aiguë myéloïde est définie selon l'OMS 2008 par une infiltration blastique supérieure à 20% (13). Différents critères morphologiques permettent de classer les blastes en myéloblastes (LAM) ou lymphoblastes (LAL). Typiquement, le myéloblaste est ovalaire et fait 12 à 15 microns de diamètre. Le noyau est rectangulaire ou ovalaire avec un rapport nucléo-cytoplasmique supérieur à 80%. La chromatine du noyau est composée d'un fin maillage, des nucléoles peuvent être visibles. Le cytoplasme basophile comporte ou non des granulations azurophiles avec d'éventuels fins bâtonnets appelés « corps d'Auer » (figure2-7).

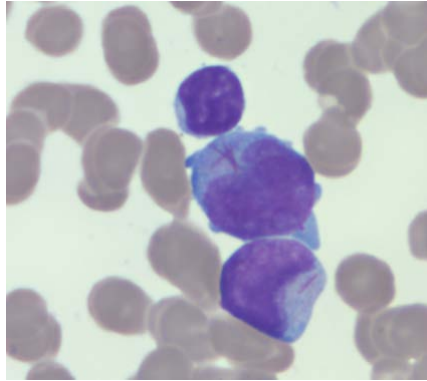


Figure 2-7 Blastes myéloïdes contenant des « corps d'Auer »

La myéloperoxydase est une activité enzymatique spécifique des blastes myéloïdes et peut être mise en évidence par une réaction cytochimique. Une réaction positive dans plus de 3% des cellules blastiques apparaît sous la forme de grains sombres à l'intérieur des blastes. De même la réaction des estérases peut être en partie utile pour distinguer l'origine monocytaire des blastes (54). A noter, que cette technique a été supplantée par la cytométrie en flux.

2.1.6.3 Immunophénotypage

Les blastes constituent une population cellulaire clonale bloquée à un stade de maturation. Ces blastes leucémiques possèdent des caractéristiques proches des cellules normales au même stade de maturation. L'immunophénotypage par cytométrie en flux multi paramétrique va aider à déterminer la lignée hématopoïétique des blastes et préciser leurs degrés de différenciation (54). La technique utilise un prélèvement de moelle osseuse ou de sang en tube EDTA. Des aliquotes de 50 000 cellules nucléées sont incubées directement avec des mélanges d'anticorps couplés à des fluorochromes. Après incubation et lyse des globules rouges, la préparation est prête à être analysée au cytomètre (55). L'expression de plusieurs marqueurs cellulaires de surface et cytoplasmiques sont analysés afin d'observer leur expression ou leur absence d'expression.

- **CD45** : marqueur pan leucocytaire souvent sous exprimé dans les cellules souches. L'expression différentielle de ce marqueur associé aux variations de granularité des cellules permet de définir une cartographie des cellules présentes dans le prélèvement (moelle ou sang) (figure 2-8) (55).

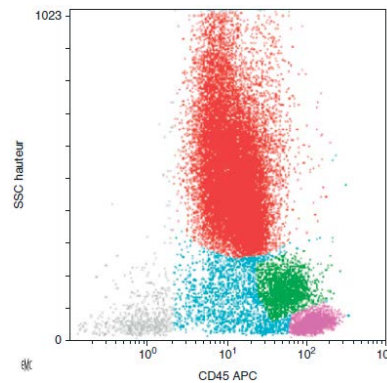


Figure 2-8 Cartographie CD45/SSC (cluster de différenciation 45/side scatter) (55)

Echantillon de moelle osseuse montrant l'expression différentielle de CD45 sur les lymphocytes (magenta), les monocytes (vert) et les granuleux (rouge). Les cellules engagées dans les voies de différenciation apparaissent en cyan (région dite des Bermudes) et les erythroblastes CD45- en gris (APC : allophycocyanin) (55)

- **CD34** : marqueur d'immaturité, c'est une glycoprotéine de surface impliquée dans l'adhésion des cellules souches aux cellules stromales (55).
- **MPO** : la myéloperoxydase enzyme marqueur de la lignée myéloïde est absente des cellules lymphocytaires et est retrouvée dans la plupart des leucémies aiguës myéloïdes. Néanmoins, les LAM peu différenciées sont MPO négatives.
- **CD13** : metalloprotéinase membranaire exprimée précocement sur les progéniteurs granuleux et les monocytes. Ce cluster de différenciation est positif dans 95% des cas de LAM (56).
- **CD15** : glycoprotéine de surface ligand des E et P sélectines, est présent sur les cellules en maturation de la lignée granuloocytaire (56).
- **CD33** : molécule d'adhésion acide sialique dépendante, exprimée sur les myéloblastes, les promyélocytes, myélocytes, monocytes et blastes dans 91% des cas de LAM.
- **CD117** : récepteur de type tyrosine kinase (c-kit) qui agit comme un récepteur de facteur de cellules souches. Le CD117 est retrouvé sur les cellules mononuclées dans la moelle normale (4%) mais aussi sur les myéloblastes, les cellules érythrocytaires, quelques mégacaryoblastes et sur les mastocytes.

Cette technique est obligatoire, notamment pour distinguer les leucémies aiguës myéloïdes peu différenciées des leucémies aiguës lymphoïdes et détecter des phénotypes particuliers

ou rares. De plus, certaines LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes (voir plus loin) possèdent des caractéristiques immunophénotypiques en étant associées avec l'expression de marqueurs non myéloïdes. Par exemple, les LAM avec translocation t(8;21) présentent une positivité pour le marqueur CD19 et parfois CD56. Cette association est donc une aide au diagnostic. Par ailleurs, certains marqueurs sont exprimés de manière anormale par rapport à un stade de différenciation ou par rapport à une lignée. Ces marqueurs sont appelés LAIP pour *leukemia associated immunophenotypes*. L'expression partielle de ces marqueurs permet de quantifier la maladie résiduelle au cours du traitement.

2.1.6.4 Génétique

L'étude génétique des hémopathies débute en 1960 avec Nowell et Hungerford avec la découverte du chromosome « Philadelphie », première anomalie chromosomique acquise. Il faudra attendre Janet Rowley en 1973, pour connaître l'origine de cette anomalie. Depuis les années 1980, l'intérêt du caryotype et des techniques de cytogénétiques moléculaires dans les hémopathies s'accroît en parallèle avec l'évolution grandissante des technologies. Les remaniements génétiques observés dans les leucémies aiguës sont utilisés d'une part comme élément diagnostique et pronostique majeur par les cliniciens et d'autre part à l'évaluation de la maladie résiduelle et de la rechute.

2.1.6.4.1 Cytogénétique conventionnelle

La cytogénétique conventionnelle est la discipline qui étudie la structure, la fonction et les anomalies des chromosomes. Elle permet une analyse globale du génome à résolution faible (10 mégabases) en identifiant en un seul temps la totalité des anomalies répertoriées dans les LAM. Il a été montré que le caryotype initial est le facteur pronostic indépendant le plus fort dans les LAM (57,58). La cytogénétique conventionnelle est prise en compte dans les essais cliniques et dans l'élaboration des protocoles thérapeutiques (51,54,59–61).

Le caryotype est indispensable à la prise en charge des LAM. Il doit être obtenu au diagnostic, avant tout traitement à partir d'un prélèvement médullaire ou sanguin (si la blastose périphérique est suffisamment importante). Il peut aussi être pratiqué sur la moelle au cours de l'évolution pour contrôler la rémission ou dépister la maladie résiduelle et à la rechute pour détecter la réapparition du clone initial et ses évolutions (60).

La technique s'effectue à partir d'un prélèvement stérile contenant des blastes : moelle osseuse, sang sur tube avec héparinate de sodium (ou milieu de culture), ganglion, liquide céphalo-rachidien voire pleural. Le prélèvement doit être acheminé rapidement, à température ambiante, au laboratoire de cytogénétique.

La culture cellulaire est l'étape préalable et nécessaire pour obtenir des cellules au stade métaphasique. Afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules mitotiques, une concentration optimale de $1 \text{ à } 2 \times 10^6$ cellules/ml est mise dans différents milieux synthétiques dépourvu de mitogène pendant 16 et/ou 24 et/ou 48 heures (culture « courte »). Cette culture s'effectue dans un incubateur humide à 37°C.

Après adjonction de colchicine (poison du fuseau mitotique) les cultures sont arrêtées bloquant les cellules en prométaphase. Il est aussi possible de synchroniser les cycles cellulaires pour obtenir, un grand nombre de cellules en métaphase en même temps. Un choc hypotonique au chlorure de potassium est réalisé suivi d'une fixation à base d'un mélange méthanol ou éthanol et acide acétique pour assurer une dispersion cellulaire optimale. Les culots cytogénétiques formés après centrifugation sont alors étalés sur lame. Les différentes techniques de dénaturations complétées par une coloration au Giemsa permettent d'obtenir un marquage ou *banding* chromosomique R (reverse) par dénaturation à la chaleur ou G (Giemsa) par dénaturation enzymatique à la trypsine. Les bandes « G » correspondent aux zones de réplication tardive. Les bandes « R » sont le négatif des bandes « G » (61).

Les métaphases sont ensuite analysées et digitalisées à l'aide d'un microscope relié à une caméra afin être analysées. Vingt métaphases au minimum doivent être analysées. En dessous de ce seuil, sans détection de mitose anormale, on parle d'échec de culture (51,54) . Dans ce rare cas, la cytogénétique moléculaire sur noyaux interphasiques est indispensable.

Dans les hémopathies les anomalies sont acquises et non aléatoires, on parle de clonalité. Environ deux cents anomalies de structure ou de nombre (translocation, inversion, insertion, délétion,...) ont été décrites dans les LAM. Elles peuvent être récurrentes (spécifiques), primaires ou secondaires. Une anomalie clonale chromosomique est définie par au moins deux mitoses possédant le même gain chromosomique ou la même anomalie de structure et par la présence de trois mitoses présentant la même perte chromosomique.

Des anomalies clonales et acquises sont retrouvées dans près de 55% des LAM de l'adulte (54). Les translocations équilibrées et inversions récurrentes reconnues par l'OMS sont à rechercher. Ces dernières sont facilement identifiables et exceptionnellement cryptiques (l'inversion du chromosome 16, par exemple).

Le caryotype est rendu en « formule chromosomique » conformément à la nomenclature internationale (ISCN 2013). A noter, que le bras court des chromosomes sont nommés par la lettre « p » et les bras longs par la lettre « q ».

2.1.6.4.2 Cytogénétique moléculaire

Les techniques de cytogénétique moléculaire par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sont complémentaires au caryotype. La FISH permet de préciser un remaniement complexe, identifier une anomalie cryptique ou évaluer la maladie résiduelle (59). En effet, la résolution de cette technique est d'une centaine de kilobases. Cette technique ciblée, se base sur la propriété d'association de régions chromosomiques données avec une sonde couplée à des fluorochromes, grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques, permettant une hybridation spécifique. Ainsi, la sonde après dénaturation (thermique ou chimique) s'apparie spécifiquement à la séquence complémentaire cible présente sur les chromosomes. Le fluorochrome couplé à la sonde permet de visualiser la position, le nombre d'exemplaires et l'intégrité des séquences chromosomiques cibles (figure 2-9) (62).

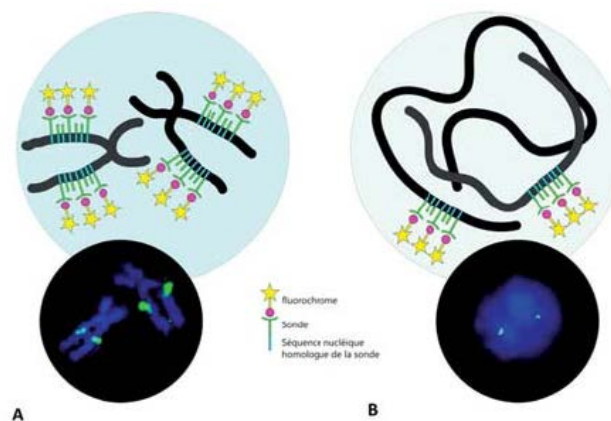


Figure 2-9 Principe de l'analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur chromosome d'une cellule en métaphase (A) et d'une cellule interphasique ou noyau (B) (62)

La FISH, réalisée aussi bien sur métaphases que sur noyaux permet une analyse à l'échelon moléculaire. La FISH sur cellules métaphasiques permet d'étudier les remaniements géniques et la modification chromosomique consécutive à cette altération. Ce type d'analyse impose une étape préalable de culture cellulaire. La FISH interphasique, est très utile pour repérer la présence d'une anomalie de faible proportion dans la population cellulaire.

En fonction de l'information recherchée le cytogénéticien dispose de différentes sondes (figure 2-10) :

- sondes « centromériques » : détectent les anomalies de nombre.
- sondes « peinture chromosomique » : spécifiques d'un chromosome entier aide à l'identification de translocations cryptiques, d'insertions et de marqueurs dans les

caryotypes complexes. Certains mélanges de sondes de peintures chromosomiques permettent de réaliser « un caryotype moléculaire » (M-FISH ou SKY) pour élucider de multiples réarrangements complexes.

- sondes locus-spécifiques : décèlent les translocations, les délétions ou les amplifications géniques.

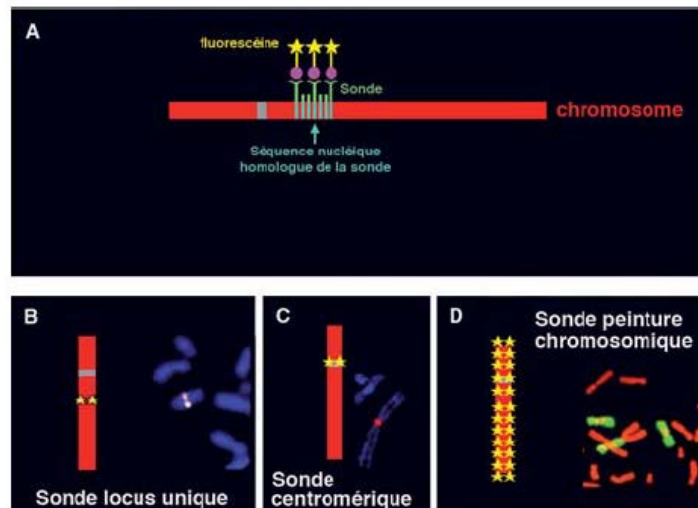


Figure 2-10 Schéma représentatif de l'hybridation d'une sonde marquée par une molécule fluorescente et de sa séquence d'ADN sur un chromosome (A) et schémas et images représentatives d'une sonde locus spécifique (B), d'une sonde centromérique (C) et d'une sonde de peinture chromosomique (D) (63)

Sur les schémas, les chromosomes sont représentés en rouge, les centromères par un rectangle gris et la fluorescence de la sonde avec des étoiles jaunes. Sur les photographies, les chromosomes sont contre colorés par le diaminophényl indole (DAPI, coloration bleue) (B,C) ou de l'iodure de propidium (rouge) (D) (63)

2.1.6.4.3 **Biologie moléculaire**

2.1.6.4.3.1 *RT-PCR / QRT-PCR*

La biologie moléculaire par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), RT-PCR pour Reverse Transcriptase ou PCR quantitative peut détecter les gènes de fusion associés aux translocations récurrentes. Les plus fréquents sont : RUNX1-RUNX1T1, CBF β -MYH11, MLLT3-MLL, PML-RAR α . Cette option technique est utile lorsque la morphologie des chromosomes est de qualité pauvre ou en cas de discordance entre la cytologie et le caryotype (54). Pour cela, le diagnostic moléculaire requiert un prélèvement de moelle osseuse ou de sang sur EDTA (selon le pourcentage de blastes périphériques). Idéalement de l'ADN et de l'ARN sont extraits et des cellules viables sont cryo-conservées. L'ARN est préférable pour étudier les transcrits de fusion.

2.1.6.4.3.2 Recherche de mutations

Au cours la dernière décennie, l'étude moléculaire des remaniements récurrents décrits en cytogénétique conventionnelle a permis de mettre en évidence des mutations acquises récurrentes dans des gènes impliqués dans la leucémogénèse. L'identification de ces anomalies moléculaires a permis, non seulement, d'améliorer les connaissances fondamentales sur les LAM (cf chapitres étiologies et physiopathologie), mais aussi de modifier la prise en charge, le pronostic et de permettre un suivi moléculaire de la réponse aux chimiothérapies et de développer de nouveaux traitements (51). Actuellement, la recherche des mutations *NPM1*, *FLT3-ITD* et *CEBP α* est recommandée en routine, au diagnostic, chez les patients présentant un caryotype normal. Ces trois marqueurs modifient la classification pronostique cytogénétique et sont nécessaires pour l'indication d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (13,51,54).

- ***Nucleophosmine ou Nucleolar phosphoprotein B23 ou Numatrin (NPM1)*** : NPM1 est une phosphoprotéine codée par un gène situé en 5q35. NPM1 est une protéine chaperonne qui en fonction de sa concentration et de sa localisation joue des rôles différents. Sa localisation préférentielle, à l'état physiologique, est nucléaire bien qu'elle fasse la navette entre le noyau et le cytoplasme. A faible taux, elle se comporte comme un gène suppresseur de tumeur en stabilisant P53, tandis qu'à forte concentration la protéine augmente la synthèse des ribosomes et provoque une prolifération incontrôlée (64). En 2005, l'équipe de Falini et al, découvre une localisation aberrante de NPM1 dans 35% des LAM de novo. Cette délocalisation est la conséquence de mutations au sein de l'exon 12 du gène *NPM1* aboutissant dans plus de 95% des cas à une insertion de quatre paires de bases en position 960. D'autres variant existent et plus de quarante mutants ont été décrits. La mutation de *NPM1* est toujours hétérozygote et provoque un décalage du cadre de lecture ainsi qu'une modification de l'extrémité C terminale de la protéine. Cette modification forme un site de « signal d'exportation du noyau » qui se traduit par la délocalisation cytoplasmique de NPM1 observée en immunohistochimie (figure 2-11) (64,65).

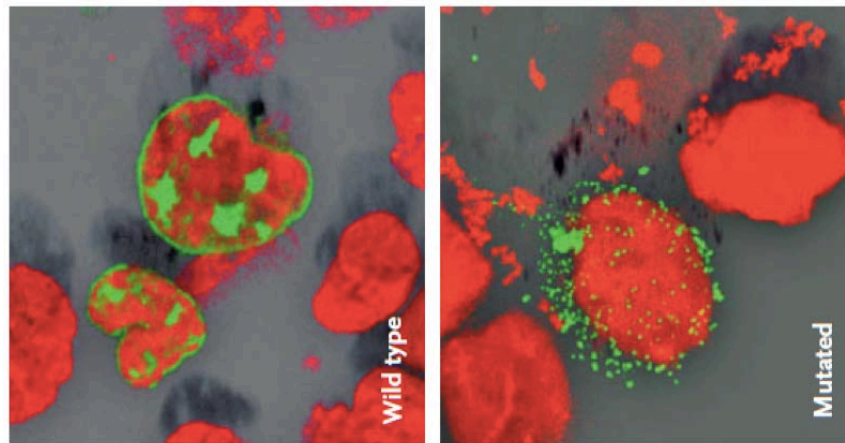


Figure 2-11 Délocalisation cytoplasmique de la protéine NPM1 mutée (65)

Reconstruction tridimensionnelle d'images en microscopie confocale de cellules NIH-3T3 transfectée avec des plasmides codant pour les allèles NPM1 normaux (Wild type) et mutés (mutated) marqués par un marqueur fluorescent vert ; le noyau est contre coloré à l'iodure de propidium (rouge). La protéine normale est localisée à la membrane nucléaire et au nucléole, alors que NPM1 muté montre une localisation cytoplasmique aberrante (65)

- ***FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3), Fetal liver kinase 2 (FLK-2) ou Human stem cell kinase 1 (STK-1)***: Les mutations du gène *FLT3* sont présentes dans 25 à 30% des LAM (13,51,64,66). Le gène *FLT3* situé en 13q12.1 code pour un récepteur de tyrosine kinase de classe III. La protéine possède cinq domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire, un domaine juxta-membranaire et deux domaines tyrosine kinase (figure 2-12). *FLT3* agit sur la prolifération, la différenciation et la survie des cellules multipotentes. Normalement exprimé par les progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes, son expression diminue au cours de l'hématopoïèse (64). A l'état normal, la protéine s'active en se dimérisant au contact de son ligand. La dimérisation induit la phosphorylation du domaine tyrosine kinase qui devient actif et induit une cascade d'évènements. On connaît deux types de mutations : FLT3-ITD ou duplications en tandem dans les exons 14 ou 15 (domaine juxta-membranaire) et, plus rare, FLT3-TKD mutation non-sens dans l'exon 20 codons 835 et 836 (boucle d'activation du domaine tyrosine kinase). La résultante est une phosphorylation constitutive du récepteur et donc une activation des voies de signalisations PI-3kinase/AKT, STAT5 et inhibition de la voie RAS/MAP kinase. Il y a donc une augmentation de la survie, prolifération cellulaire et arrêt de la différenciation (47,66,67).

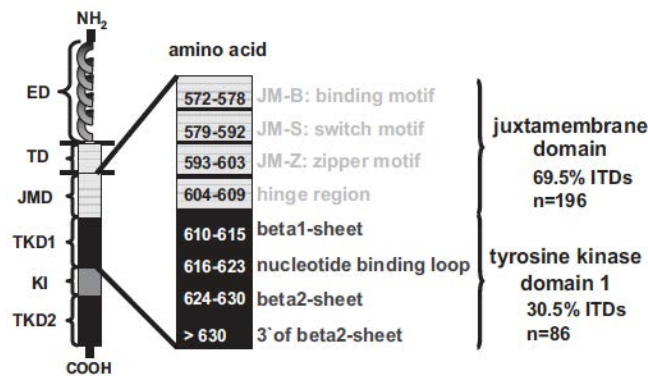


Figure 2-12 Structure schématique du récepteur FLT3 (68)

Il est constitué par le domaine extracellulaire (ED), le domaine transmembranaire (TD) et un domaine cytoplasmique contenant le domaine juxta-membranaire (JMD) aussi bien que le domaine kinase divisé en 2 parties par une petite kinase d'insertion (KI) (68)

- **CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBP α):** CEBP α est une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription à région leucine zipper (bZIP). Le gène *CEBP α* est situé en 19q13.1 et ne possède pas d'intron. Il se compose de 4 domaines : l'extrémité C-terminale de liaison à l'ADN, la région leucine zipper de dimérisation et 2 domaines de transactivation (TAD1 et TAD2) en N-terminal (69–71). Deux isoformes sont générés : la protéine p30 et la protéine p42 (66,69). Cette dernière agit, à l'état normal, comme un facteur de transcription jouant un rôle crucial dans la différenciation de divers types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques. Mais CEBP α a d'autres actions comme la répression de l'expression de *c-MYC* permettant la différenciation, l'augmentation de l'expression des gènes spécifiques de la lignée granulocytaire et la modification d'autres gènes clé du développement myéloïde (*PU.1* par exemple). Trois mécanismes d'inactivation de CEBP α ont été décrits (70):

- la répression de l'expression de CEBP α par le transcrit de fusion RUNX1-RUNX1T1
- l'inhibition de la traduction de l'ARNm *CEBP α* par l'interaction avec hnRNPE2 induit par la protéine de fusion BCR-ABL
- les mutations de *CEBP α* (figure 2-13)

Les mutations de *CEBP α* sont retrouvées dans environ 15% des LAM. L'ensemble du gène peut être atteint. Toutefois, les altérations se concentrent soit en N-terminal (mutation *frame-shift*) et exercent un effet dominant négatif, soit à l'extrémité C-terminale (délétion/insertions *in frame*) altérant la liaison à l'ADN ou la dimérisation. Trois types de mutants *CEBP α* se distinguent dans les LAM (71):

- les LAM porteuses d'une mutation mono-allélique
- les LAM avec une double mutation de *CEBP α* touchant la région N-terminale et souvent bi-allélique

- les LAM avec une mutation homozygote de CEBPA par perte d'hétérozygotie

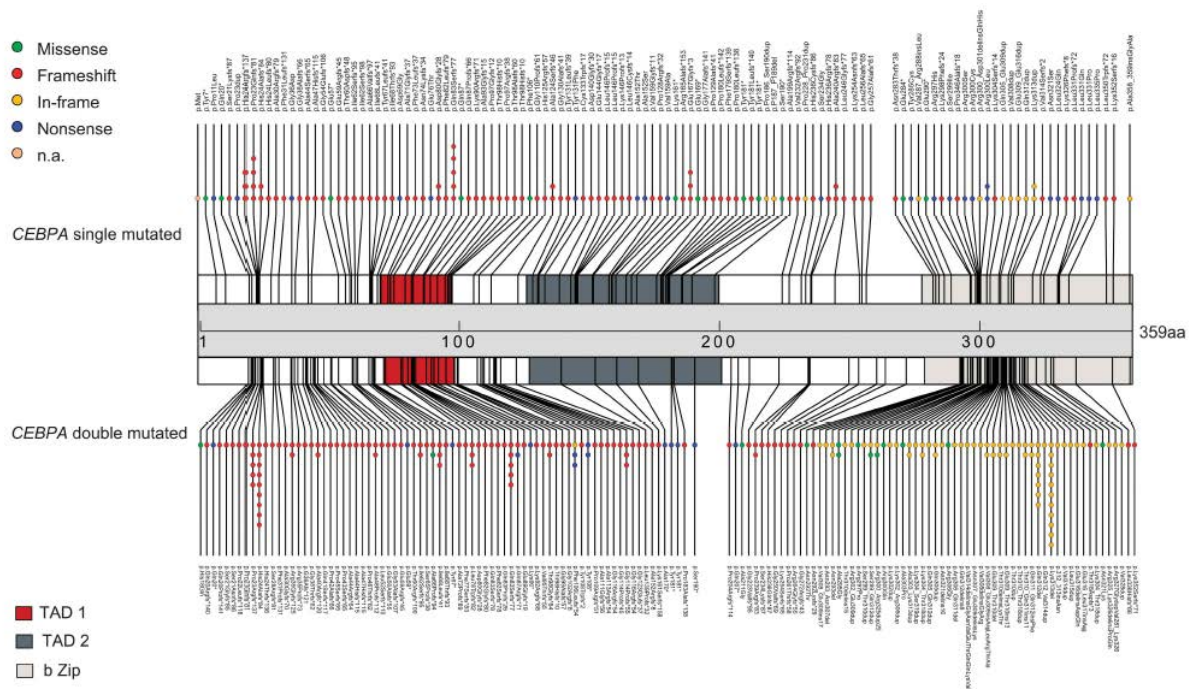


Figure 2-13 Mutations moléculaires dans CEBPα (71)

Le nombre de mutation est reflété par le nombre de spots colorés. Ces derniers indiquent aussi l'effet de la mutation au niveau de l'acide aminé (71).

2.1.7 Diagnostic différentiel

La question du diagnostic différentiel se pose avec la grande variabilité clinico-biologique d'entrée dans la maladie. Ainsi, à l'hémogramme devant la/les cytopénies peuvent être évoqués : un syndrome myélodysplasique, une aplasie médullaire, un cancer métastasé à la moelle, une maladie de Biermer voir un hypersplénisme (surtout si il y a une splénomégalie). Inversement, une hyperleucocytose peut orienter vers une infection bactérienne, un syndrome myéloprolifératif ou lymphoprolifératif. Cette interrogation est rapidement résolue avec la mise en évidence d'un taux de blastes supérieur à 20% dans la moelle osseuse signant le diagnostic de leucémie aigüe. Le caractère myéloïde différentiel du lymphoïde est affirmé par les examens complémentaires de cytologie et de cytométrie en flux.

2.1.8 Classifications

La morphologie cellulaire a longtemps été le critère principal de classement des LAM définissant la classification FAB. Mais, la caractérisation d'anomalies génétiques et de mutations récurrentes d'importance pronostique a amené l'organisation mondiale de la santé (OMS) à proposer une nouvelle classification intégrant les données morphologiques, cytochimiques, immunophénotypiques, génétiques et cliniques. La dernière version date de 2008 et a été établie sur avis d'experts cliniciens et scientifiques mondiaux. Toutefois, bien que la classification OMS 2008 permette d'instaurer un langage commun international nécessaire aux études cliniques et thérapeutique, la classification FAB reste encore utilisée en routine.

2.1.8.1 Classification Franco-Americano-Britannique (FAB)

Proposée dès 1976, cette classification s'établie qualitativement sur la cytologie et quantitativement sur l'infiltration blastique (>30%) et les stigmates de différenciation myéloïde sur frottis sanguin et/ou médullaire. Ainsi, le FAB distingue huit types de LAM (51,72) (<http://hematocell.univ-angers.fr>).

- **Leucémie aigüe myéloïde peu différenciée LAM 0** : Rares, leur morphologie est très proche des celle des LAL. Les blastes sont très indifférenciés et n'expriment pas la myéloperoxydase. L'origine myéloïde est confirmée par l'immunophénotypage. L'association avec une mutation du gène *AML1/RUNX1* est fréquente.
- **Leucémie aigüe myéloïde sans maturation LAM 1** : La blastose est importante et la maturation de la lignée granuleuse est faible (<10%). La réaction aux myéloperoxydases est positive dans au moins 3% des blastes.
- **Leucémie aigüe myéloïde avec maturation LAM 2** : La maturation granuleuse est importante (>10%). Les blastes présentent fréquemment un corps d'Auer. Dans certains cas le corps d'Auer est unique, fin avec un bout effilé (figure 2-14). Les blastes sont larges, le cytoplasme basophile abondant contient des granules azurophiles. Cette morphologie particulière est souvent associée à une translocation *t(8;21)(q22;q22)* et un transcrite *RUNX1-RUNX1T1*.

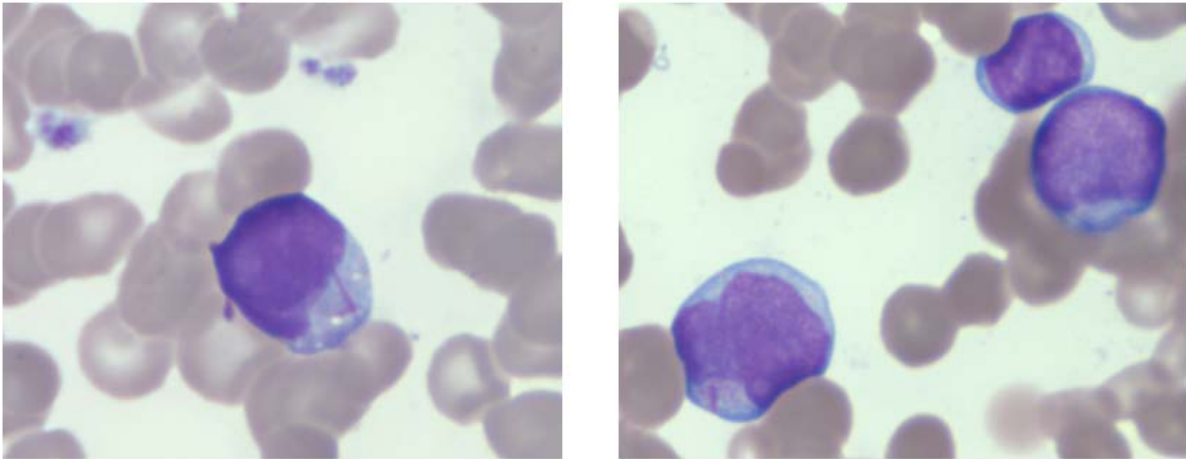


Figure 2-14 Blastés myéloïdes de LAM2 contenant des corps d'Auer associée à une t(8;21)(q22;q22)

- **Leucémie aigüe myéloïde promyélocytaire LAM 3** : Ce type de LAM est particulier de par la présentation clinique et biologique. Les cellules leucémiques ont un aspect très granuleux avec la présence caractéristique de corps d'Auer en fagots. Il existe aussi une variante cytologique microgranulaire. La translocation t(15;17)(q24;q21) typique, impliquant les gènes *PML* et *RARα* fait l'objet d'un traitement ciblé.
- **Leucémie aigüe myéloïde myélo-monocytaire LAM 4** : Prolifération de blastés associée à une différenciation myéloïde et monocytaire. La réaction cytochimique des estérases permet d'identifier les éléments à différenciation monocytaire. La présence d'éosinophiles médullaires morphologiquement anormaux singularise le sous type **LAM 4eo** associé à une inversion péricentrique du chromosome 16 entraînant la formation du transcrite de fusion CBFβ-MYH11.
- **Leucémie aigüe myéloïde monoblastique et monocytaire LAM 5** : Les cellules de la lignée monocytaire (monoblaste, promonocyte, monocyte) prédominent (>80%). Deux sous types **LAM 5a** et **LAM 5b** se distinguent par le taux blastés médullaires (monoblastes + promonocytes). La réaction des estérases est positive et celle des myéloperoxydases est parfois négative.
- **Leucémie aigüe érythroblastique LAM 6** : Il existe 2 types de LAM6. L'érythroleucémie ou LAM érythroïde/myéloïde avec un excès d'érythroblastés anormaux (>50%) dans l'ensemble de la population cellulaire nucléée et les myéloblastés représentent au moins 20% de l'ensemble des éléments non érythroïde de la moelle osseuse. La leucémie érythroblastique pure se caractérise par plus de 80% de blastés de morphologie indifférenciée ou érythroblastique et l'absence de composante myéloblastique. Il n'y a pas d'anomalie génétique spécifique, mais on peut retrouver des caryotypes complexes avec des anomalies de structure des chromosomes 5,7 et 8.

- **Leucémie aigüe mégacaryoblastique LAM 7** : Rare, cette classe est caractérisée par la présence d'au moins 20% de blastes dont la moitié appartient à la lignée mégacaryocytaire. Le cytoplasme basophile des mégacaryoblastes peut avoir des pseudopodes ou « blebs ». A l'immunophénotypage les mégacaryoblastes sont positifs pour une glycoprotéine plaquettaire au minimum : les glycoprotéines IIb/IIIa (CD41), IIIa (CD61), Ib (CD42). On ne décrit pas d'anomalie cytogénétique récurrente.

2.1.8.2 Classification OMS 2008

La plétore d'études moléculaires sur les mécanismes de la leucémogénèse et l'essor des nouvelles techniques ont amené à proposer, initialement en 2001 puis actualisée en 2008, la classification OMS (tableau 2-3). Cette dernière définit plusieurs groupes (13,64,73).

Tableau 2-3 Classification des Leucémies aiguës myéloïdes de l'OMS 2008 (51)

<p>LAM avec anomalies génétiques récurrentes LAM avec t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> LAM avec inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> LAM avec t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i> LAM avec t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> LAM avec t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> LAM avec inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EV11</i> LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKLI1</i> Entité provisoire : LAM avec mutation de <i>NPM1</i> Entité provisoire : LAM avec mutation de <i>CEBPA</i></p>
<p>LAM associées à des anomalies de type myélodysplasie</p>
<p>LAM thérapie-induites</p>
<p>LAM sans spécificité particulière LAM avec différenciation minimale LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aigüe myélo-monocytaire Leucémie aigüe monoblastique/monocytaire Leucémie aigüe érythroïde - leucémie aigüe érythroïde pure - érythroleucémie, érythroïde et myéloïde Leucémie aigüe mégacaryoblastique Leucémie aigüe basophile Panmyélose aigüe avec myélofibrose</p>
<p>Sarcome myéloïde</p>
<p>Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down (trisomie 21) Myélopoïèse anormale transitoire Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down</p>
<p>Néoplasie à cellules dendritiques blastiques plasmacytoïdes</p>

2.1.8.2.1 Les LAM avec anomalies génétiques récurrentes

Ce groupe comprend d'une part les LAM avec translocations (ou inversions) équilibrées. Ces anomalies de structure créent un gène de fusion codant pour une protéine chimérique détectable par RT ou RQ-PCR. Trente pourcent des LAM sont concernées. La plupart de ces leucémies ont une présentation clinique et immunophénotypique caractéristique, d'où une forte corrélation entre morphologie et génétique. Les translocations : t(8;21)(q22;q22), t(16;16)(p13;q22) ou inv(16)(p13;q22) impliquent les gènes du *core binding factor* (CBF). Les

gènes *RUNX1* (aussi nommé *AML1* ou *CBF α*) et *CBF β* codent pour les sous unités alpha et bêta du facteur de transcription CBF essentiel à l'hématopoïèse. La présence des t(8;21), t(16;16) ou inv(16) et t(15;17) suffisent à affirmer le diagnostic de leucémie aigüe quel que soit le pourcentage de blastes leucémiques médullaires.

Le groupe des leucémies aiguës avec translocation t(9;11)(p22;q23) a été individualisée car son pronostic est meilleur (intermédiaire) que celui des leucémies aiguës avec réarrangement du gène *MLL* (mauvais). En effet, plus de quatre-vingt autres translocations impliquant *MLL* (*myeloid lineage leukemia*) ont été décrites et une soixantaine de partenaires sont connus (figure 2-15).

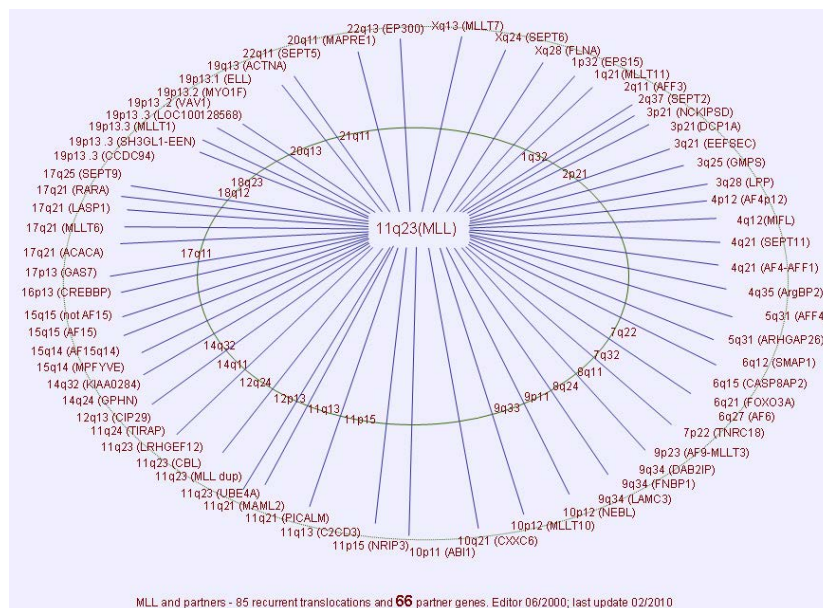


Figure 2-15 Partenaires de *MLL* (74)

D'autre part, l'OMS distingue les LAM avec mutations spécifiques. Seules ou en combinaison les mutations des gènes *FLT3*, *NPM1* et *CEBP α* ont été rapportées dans les LAM, le plus souvent à caryotype normal où elles avaient un impact pronostic non négligeable. Ainsi, deux entités provisoires de LAM associées aux mutations de *NPM1/FLT3*- ou de *CEBP α /FLT3*- ont été proposées.

2.1.8.2.2 Les LAM avec signes (cytologiques et/ou génétique) évoquant une myélodysplasie

Cette catégorie représente 24 à 35% des cas de LAM et touche principalement les sujets âgés. Ces LAM sont définies par la présence d'au moins 20% de blastes médullaires ou

circulants associée à un antécédent de syndrome myélodysplasique (SMD), une anomalie cytogénétique caractéristique des SMD ou la présence d'une dysplasie multilignée et l'absence de thérapie cytotoxique antérieure ou d'anomalies cytogénétiques récurrentes des LAM. Au niveau cytogénétique on constate la perte de chromosome : -7/del(7q) et -5/del(5q) avec un caryotype complexe.

2.1.8.2.3 Les hémopathies myéloïdes induites par des traitements cytotoxiques

Depuis 2008 les leucémies aiguës induites par des traitements cytotoxiques sont identifiées comme un groupe à part entière au sein de la classification OMS. Ce groupe inclut l'ensemble des hémopathies myéloïdes induites. Cependant, la plupart des patients concernés ont reçu, le plus souvent, un traitement avec des agents alkylants et/ou des radiations aussi bien que des inhibiteurs de topoisomérase II. Ainsi, il n'est plus recommandé de subdiviser ce groupe en fonction de la classe thérapeutique reçue.

2.1.8.2.4 Les LAM sans aucune particularité

Cette entité regroupe tous les cas qui ne répondent pas aux définitions des groupes précédents. Les critères morphologiques de la classification FAB sont repris en supprimant la numérotation et en abaissant le seuil de blastes nécessaire à 20%.

2.1.8.2.5 Proliférations myéloïdes et trisomie 21

Dans 66% des cas il s'agit d'une LAM 7 selon la classification FAB. Un pourcentage de blastes supérieur à 20% n'est pas obligatoire pour le diagnostic. Le profil génétique se singularise dans près de 100% des cas avec la mutation du facteur de transcription *GATA1* et la présence de copies additionnelles des chromosomes 8 et 21 (en plus de la trisomie 21 constitutionnelle). En revanche, le pronostic favorable est lié à une bonne réponse à la chimiothérapie à base de cytarabine. D'ailleurs, ces particularités morphologiques, immunophénotypiques, cliniques et moléculaires classent la leucémie myéloïde en entité unique selon l'OMS 2008 (12,13,73).

2.1.9 Facteurs pronostiques

Les facteurs pronostiques peuvent être subdivisés entre ceux reliés aux caractéristiques du patient et ceux dépendant de la maladie elle-même. Le premier groupe qui prend en compte l'état général du patient permet notamment d'estimer la mortalité thérapeutique induite (TMR, *treatment-related mortality*). Le second groupe, contenant plus de critères permet de prédire, entre autre, la réponse au traitement d'induction (54).

2.1.9.1 Facteurs liés au patient

2.1.9.1.1 L'âge

L'âge est un facteur de mauvais pronostic important (75,76). Les patients plus âgés ont une évolution plus défavorable que les patients jeunes. Un déclin constant du pronostic est constaté de l'enfant à la personne âgée. Cette relation se traduit par une diminution de la réponse au traitement et de la survie. En effet, les patients de plus de 60 ans présentent une probabilité de réponse à la thérapie estimée entre 45 et 55% et moins de 10% d'entre eux ont une survie à 5 ans. En revanche, les malades de moins de 60 ans, ont une réponse au traitement de 75% et 35 à 40% d'entre eux survivent à 5 ans (77). Cette différence peut s'expliquer par un état général réduit (performans status pauvre) chez les personnes âgées qui par conséquent tolèrent moins bien les chimiothérapies intensives et leurs effets secondaires. De plus, les malades âgés cumulent une forte incidence de facteurs péjoratifs comme la cytogénétique de pronostic défavorable, les leucémies secondaires et comorbidités importantes. L'étude de Julisson et al (76) montre que l'âge n'est pas la seule raison pour refuser un traitement à un patient. L'évaluation et la documentation des comorbidités sont essentielles pour la décision thérapeutique. En 2006, Appelbaum et al (75) établissent à travers l'étude de 5 cohortes (968 patients atteints de LAM, hors LAM 3) du SWOG (*SouthWest Oncology Group*) que l'âge a un effet modeste sur les patients ayant un très bon performans status. En revanche, chez les patients de plus de 75 ans avec un performans status de 3, 82% des patients meurent dans les 30 premiers jours du traitement d'induction (tableau 2-3). La même étude montre que le pourcentage de patients avec une cytogénétique défavorable augmente en passant de 35% chez les moins de 56 ans à 51% chez les plus de 75 ans (figure 2-16).

Tableau 2-4 Mortalité dans les 30 premiers suivant l'initiation du traitement d'induction (75)

	Younger than 56 y	56-65 y	66-75 y	Older than 75 y
No. patients	364	242	270	79
Early deaths* by performance status, no./no. total patients (%)				
0	3/129 (2)	8/72 (11)	9/73 (12)	2/14 (14)
1	6/180 (3)	6/112 (5)	20/126 (16)	7/40 (18)
2	1/46 (2)	6/34 (18)	16/52 (31)	7/14 (50)
3	0/9 (0)	7/24 (29)	9/19 (47)	9/11 (82)

Patients with known prestudy performance status are included.
 *Within 30 days of registration to the trial.

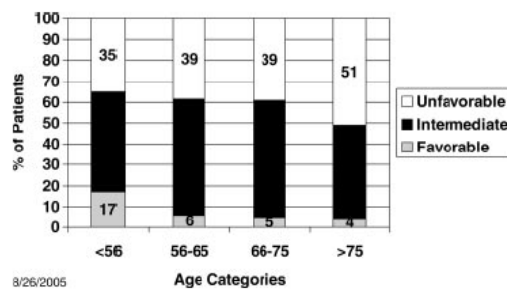


Figure 2-16 Groupes de risque cytogénétique des patients du SWOG par catégorie d'âge (75)

2.1.9.1.2 Comorbidités

L'équipe de FJ.Giles (78) en utilisant le score HCTCI montre que les comorbidités pré induction chez les patients atteints de LAM de plus de 60 ans sont prédictives de la survie et du décès précoce. L'index de comorbidité des transplantations cellulaires (HCTCI, *haematopoietic cell transplantation comorbidity index*) est un score initialement utilisé pour estimer la mortalité et la survie post transplantation cellulaire. Ainsi, sur une cohorte de 177 patients 22% avaient un score à 0, 30% à 1 ou 2 et 48% supérieur ou égal à 3. La médiane de survie dans ces trois groupes était respectivement de 45 ; 31 et 19 semaines (figure 2-17).

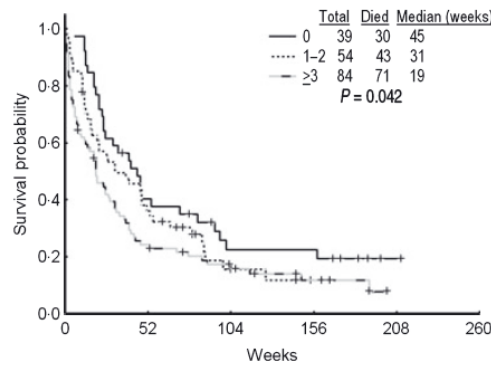


Figure 2-17 Courbes de survie selon l'index HCTCI (*Haematopoietic cell transplantation comorbidity index*) chez 177 patients atteints de LAM de plus de 77 ans traités en induction par Idarubicine et Cytarabine (78)

2.1.9.1.3 **Le sexe**

Plusieurs études de phases III chez des patients atteints de LAM non traitées ont suggéré une meilleure survie chez les femmes (77). Cependant, l'analyse démographique de Appelbaum et al (75) trouve un sexe ratio identique quel que soit l'âge.

2.1.9.1.4 **Antécédents oncologiques et hématologiques**

Le pronostic des LAM thérapies induites ou secondaires à un syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif chronique est mauvais en comparaison aux LAM de novo (13,51,79). La survie à 5 ans est inférieure à 10% (13). Cette différence peut s'expliquer par la forte influence d'un caryotype anormal (anomalies des chromosomes 5 et 7) et/ou complexe et à l'expression de phénotype de résistance aux drogues (MDR, *multidrug resistance*) (51,80). D'autres facteurs sont potentiellement responsables du mauvais devenir des LAM secondaires (79):

- la persistance de la maladie primaire
- la défaillance des organes soumis à plusieurs chimiothérapies
- les cytopénies prolongées consécutives à la déplétion iatrogène des cellules souches hématopoïétiques
- l'immunosuppression chronique

2.1.9.2 Facteurs liés à la leucémie

Ce groupe inclus la leucocytose au diagnostic, la cytogénétique et la biologie moléculaire des cellules au diagnostic. D'autres critères cliniques (splénomégalie) et biologiques (taux élevé des LDH) ont été assimilés à un impact pronostique variable selon les études (54,81).

2.1.9.2.1 Leucocytose

Selon différentes études le taux de leucocytes au diagnostic constitue un facteur pronostique indépendant (77). Bien que le seuil de leucocytes fasse l'objet de discordances, une leucocytose >50 G/L est associée à un taux de réponse complète réduit et à une augmentation du taux de rechute (82). La numération leucocytaire est aussi un facteur pronostique au sein de leucémies à caryotype dit favorable (figure 2-18). En cas de translocation t(8;21), inv(16) et t(15;17) associée à une hyperleucocytose le pronostic s'assombrie (77,82).

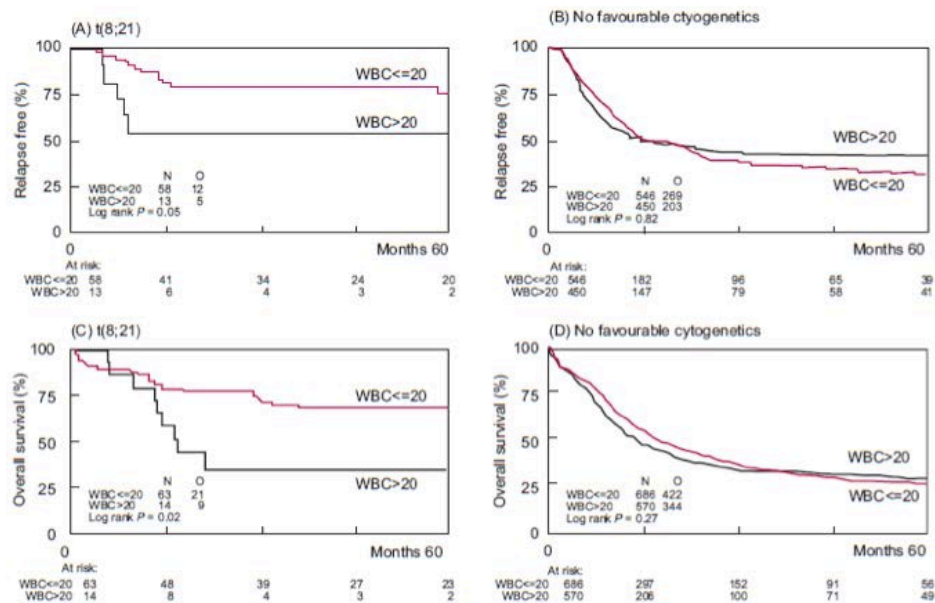


Figure 2-18 Impact du nombre de leucocytes sur le pronostic des leucémies aiguës myéloïdes t(8;21) (77)

Probabilité de rechute après rémission complète (A) et les bons répondeurs avec cytogénétique défavorable (B). Survie chez les patients avec une LAM t(8;21) (C) et pour les patients à cytogénétique défavorable. (D). Une leucocytose de $20 \times 10^9/L$ ou plus a un impact négatif sur les LAM t(8;21) mais pas sur les autres LAM. (N : nombre de cas et O : nombre d'événements) (77)

2.1.9.2.2 Immunophénotypage

La valeur pronostique de l'immunophénotypage est controversée dans les LAM (77,82). Certaines études ont démontrés que l'expression du CD34 était un critère péjoratif (83), de même que l'association avec des marqueurs lymphoïdes (CD2, CD19). Dans cette dernière association est souvent retrouvée un chromosome Philadelphie ou une anomalie du gène *MLL* (84). Néanmoins, la revue de KD.Mason et al (56), conclue que les seuls marqueurs incontestés sont le CD11b, présent dans 50% des LAM, lié à un mauvais pronostic et le CD15 relié, lui, à une meilleure évolution.

2.1.9.2.3 Morphologie

La présence de signes de dysplasie comme impact pronostique a fait l'objet d'études. La dysmyélopoïèse est essentiellement retrouvée dans les LAM secondaires et rarement dans les LAM de novo couplées à un caryotype de mauvais pronostic (82). Une étude allemande sur 614 patients présentant une LAM de novo indique que le caractère dysplasique des cellules n'influence pas le taux de rémission ni la survie, surtout lorsque la cytogénétique est prise en compte (tableau 2-5) (81).

Tableau 2-5 Corrélation entre groupes de risque cytogénétique et caractères dysplasiques selon le WHO (81)

Risk Group	OS			EFS		
	0 + 1 Dysplasia	Multilineage Dysplasia (2 + 3)	P	0 + 1 Dysplasia	Multilineage Dysplasia (2 + 3)	P
Favorable risk			.36			.92
Rate at 5 years ± SD, %	61.8 ± 7.76	75.0 ± 21.65		49.2 ± 7.98	32.1 ± 25.5	
Median, months	NR	NR		51	46	
Intermediate risk			.19			.19
Rate at 5 years ± SD, %	16.4 ± 4.4	33.1 ± 8.78		15.7 ± 4.09	24.3 ± 6.53	
Median, months	14	27		8	16	
Unfavorable risk			.16			.93
Rate at 5 years ± SD, %	5.9*	0*		2.3	0	
Median months	8	7		4	2	

Abbreviation: NR, not reached.

*Rate at 3 years.

2.1.9.2.4 Classification FAB

Le type de la classification FAB ne semble pas être un paramètre pronostique indépendant (81,82). On note, cependant, que les LAM 3, LAM 3 variante et LAM 4 éosinophile on une meilleure survie que les autres sous types de FAB (figure 2-19).

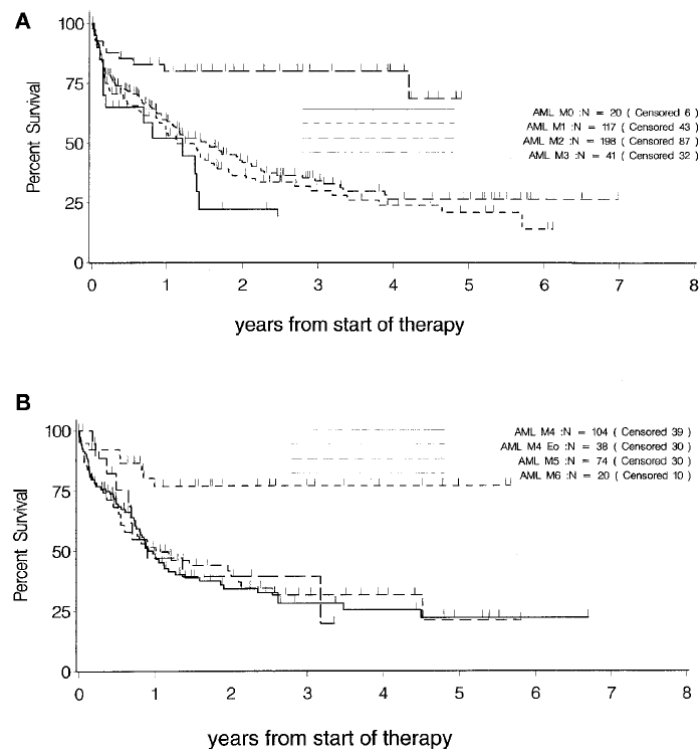


Figure 2-19 Coubes de survie chez les patients classés selon les critères du FAB (81)

(A) Médiane de survie pour les leucémies aiguës myéloïdes LAM 0, 15 mois ; LAM 1, 14 mois ; LAM 2, 18 mois et LAM 3 variant, non atteint ; et (B) médiane de survie pour les LAM 4, 11 mois ; LAM4eosinophile, non atteint ; LAM 5 a et b, 12 mois ; LAM 6, 11 mois (81)

Par contre les LAM 0 ont un mauvais pronostic par rapport aux LAM de novo (85). Leur devenir est identique à celui des LAM secondaires à un syndrome myélodysplasique ou myéloprolifératif (86). Ce pronostic peut s'expliquer par le fait que les LAM 0 sont fréquentes chez les sujets âgés et souvent associées à des mutations de *RUNX1* (87)

2.1.9.2.5 Cytogénétique

Dès 1984, *the fourth international workshop on chromosomes in leukemia*, étude multicentrique, établi que le caryotype est fondamental pour le pronostic des LAM (88). C'est le facteur le plus fort, prédictif de la réponse à la thérapie d'induction et de la survie (54,57,58). Rapidement, sur la base des résultats cytogénétiques obtenus avant traitement, plusieurs larges études (au sein des groupes MRC, SWOG, CALGB) sur des patients de moins de 60 ans, classent les patients en trois groupes de risque : favorable, intermédiaire et défavorable (tableau 2-6) (73,89–91).

Tableau 2-6 Variation des groupes de risque cytogénétique selon les groupes d'essais cliniques (92)

	Original MRC	SWOG/ECOG	CALGB	GIMEMA/AML10	German AMLCG	HOVON/SAKK	Refined MRC
Favorable	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)	t(15;17) t(8;21) [lacking del(9q), complex, ie, ≥ 3 unrel abn] inv(16)/t(16;16)/del(16q)	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)	t(15;17) t(8;21) alone inv/del(16) and lacking unfav abn	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)
Intermediate	Normal Other non-complex	Normal +6, +8, -Y, del(12p)	Normal Other non-complex	Normal -Y	Normal Other non-complex	Normal Other non-complex	Normal Other non-complex
Adverse	abn(3q) -5/del(5q) -7 complex [≥ 5 unrel abn] Excluding those with favorable changes	abn(3q),(9q),(11q),(21q) abn(17p) -5/del(5q) -7/del(7q) t(6;9) t(6;11) t(11;19) t(9;22) complex [≥3 unrel abn]	inv(3)/t(3;3) -7 t(6;9) t(6;11) t(11;19) +8 complex (≥ 3 unrel abn) Excluding those with favorable changes	Other	inv(3)/t(3;3) -5/del(5q) -7/del(7q) abn(11q23) del(12p) abn(17p) complex (≥ 3 unrel abn)	abn(3q) -5/del(5q) -7/del(7q) abn(11q23) t(6;9) t(9;22) complex (≥ 3 unrel abn)	abn(3q) [excluding t(3;5)] inv(3)/t(3;3) add(5q)/del(5q)/ -5,-7/add(7q) t(6;11) t(10;11) t(9;22) -17 abn(17p) with other changes Complex (> 3 unrel abn) Excluding those with favorable changes

Unrel abn indicates unrelated abnormality; abn, abnormal.

Ainsi, les leucémies myéloïdes associées aux translocations t(15;17)(q22;q12) et t(8;21)(q22;q22), inv(16) dites CBF (*core binding factor*) sont de bon pronostic dans le cadre d'un traitement par chimiothérapie intensive. Inversement, les anomalies du 3q, les délétions 5q, monosomies des chromosomes 5 et/ou 7 et les caryotypes complexes ont un sombre pronostic avec une chimiothérapie conventionnelle. Les caryotypes normaux et présentant d'autres anomalies cytogénétiques correspondent à la classe des intermédiaires.

L'étude de Grimwade en 2010 sur une cohorte de 5876 patients, approuve les résultats antérieurs et statut notamment sur les anomalies impliquant le gène *MLL* et la notion de complexité du caryotype (tableau 2-7) (73).

Tableau 2-7 Révision de la classification pronostic en analyse multivariée (73)

Cytogenetic abnormality	Comments
Favorable	
t(15;17)(q22;q21)	
t(8;21)(q22;q22)	Irrespective of additional cytogenetic abnormalities*
inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	
Intermediate	
Entities not classified as favorable or adverse	
Adverse	
abn(3q) [excluding t(3;5)(q21~25;q31~35)], inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26), add(5q), del(5q), -5, -7, add(7q)/del(7q),	Excluding cases with favorable karyotype†
t(6;11)(q27;q23), t(10;11)(p11~13;q23), t(11q23) [excluding t(9;11)(p21~22;q23) and t(11;19)(q23;p13)]	
t(9;22)(q34;q11), -17/abn(17p), Complex (≥ 4 unrelated abnormalities)	

*All favorable-risk abnormalities.
†All adverse-risk abnormalities.

En analyse multivariée, de nouveaux facteurs indépendants de mauvais pronostic apparaissent significatifs comme la perte du chromosome 17 ou l'anomalie de son bras court qui entraîne la perte du gène suppresseur de tumeur *TP53*. Les atteintes du 11q23 impliquant le gène *MLL* sont associées à une survie plus courte, seule la translocation t(9;11)(p21;q23) a un pronostic plus favorable. Le caryotype complexe défini par la présence d'au moins quatre anomalies cytogénétiques en l'absence des t(8;21), t(16;16) ou inv(16), t(15;17) est retrouvé dans 10 à 12% des patients et constamment associé à un mauvais pronostic. De même, le caryotype monosomique, décrit une nouvelle entité cytogénétique défavorable caractérisée par la présence d'une seule monosomie autosomique avec au moins une anomalie de nombre ou une anomalie de structure associée.

On observe une augmentation de l'incidence d'anomalies cytogénétiques défavorables avec l'âge ce qui contribue au mauvais pronostic des LAM chez les plus de 60 ans (75,93). En conséquence des classifications ont été proposées pour les patients âgés.

2.1.9.2.6 **Biologie moléculaire**

La mise en évidence de certaines anomalies moléculaires récurrentes a permis de mieux évaluer le devenir des patients ayant un pronostic cytogénétique intermédiaire (caryotype normal) et sont devenus nécessaires pour poser l'indication d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (51,54).

L'international *European LeukemiaNet* (ELN) est la classification qui prend en compte les altérations génétiques des LAM. Elle permet de distinguer les groupes à pronostic favorable, défavorable, intermédiaire I et intermédiaire II (tableau 2-8) (94).

Tableau 2-8 *European LeukemiaNet*. Corrélation entre les données cytogénétiques et moléculaires dans les leucémies aiguës myéloïdes avec données cliniques (94).

Genetic Group	Subsets
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype) Mutated <i>CEBPA</i> (normal karyotype)
Intermediate-I	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype) Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype) Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype)
Intermediate-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearranged -5 or del(5q) -7 abn(17p) Complex karyotype*

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; ITD, internal tandem duplication.
*Complex karyotype is defined as three or more chromosome abnormalities in the absence of one of the WHO designated recurring translocations or inversions: t(8;21), inv(16) or t(16;16), t(15;17), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) or t(3;3).

La mutation ayant l'impact pronostique le plus fort est la mutation en tandem du gène *FLT3* (95). Le pronostic des LAM à caryotype normal est significativement inférieur lorsqu'elles sont associées à la mutation *FLT3*-ITD. Le pronostic de cette altération serait lié au taux d'allèle muté (ratio allèle muté/ allèle natif). Ainsi, un ratio élevé est prédictif d'une survie inférieure. En revanche, l'impact pronostic de la mutation *FLT3*-TKD est controversé (66,67,92,96).

La mutation du gène *NPM1* dans les LAM à caryotype normal est associée à un fort taux de rémission complète et à une meilleure survie sans événement ni rechute (54,95,97,98). L'altération de *NPM1* sans mutation de *FLT3* associée s'accompagne d'une rémission complète et d'un pronostic favorable (figure 2-20) (54,66,67,96). Cependant, la mutation *NPM1* couplée à la mutation *FLT3* ne modifie pas l'effet néfaste de *FLT3* muté (95).

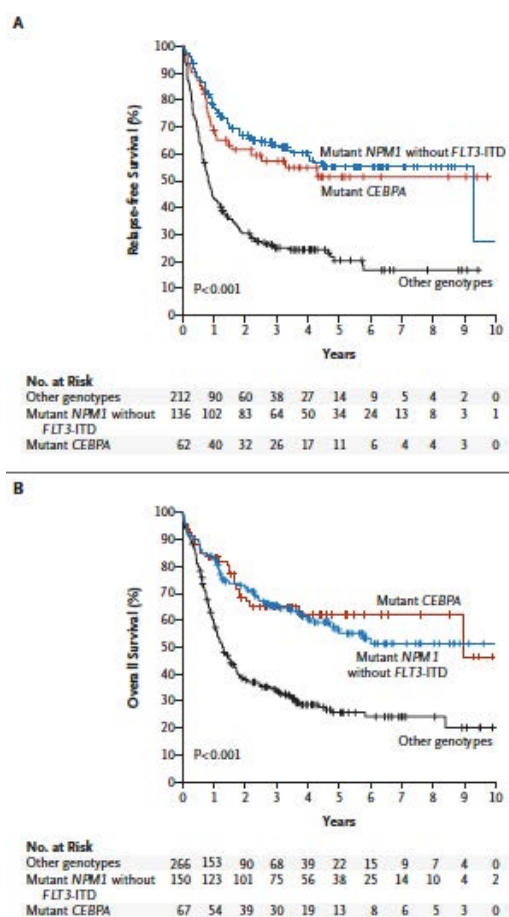


Figure 2-20 Courbes de survie de Kaplan Meier selon le génotype (99)

(A) Survie sans événement selon le génotype. (B) Survie globale selon le génotype. « Autres génotypes » est défini par le génotype *FLT3*-ITD et les triples négatifs soit : *NPM1* et *CEBPA* natifs sans *FLT3*-ITD. Les coches représentent les patients pour lesquels les données n'étaient pas accessibles la dernière fois qu'ils ont été vus vivants et/ou en rémission complète (A et B) (99)

La mutation du gène *CEBPα* confère un pronostic favorable aux patients possédant un caryotype normal (figure 2-20) (54,66,92,99–101). Bien que la mutation n’influe pas sur le taux de rémission complète, l’impact est significativement meilleur pour la survie (95,100). Cependant, des données ont montrées que le caractère favorable de *CEBPα* était restreint aux cas avec double mutations et qui n’étaient pas associés à une anomalie cytogénétique ou à la mutation *FLT3*-ITD (figure 2-21) (54,66,71,92,102).

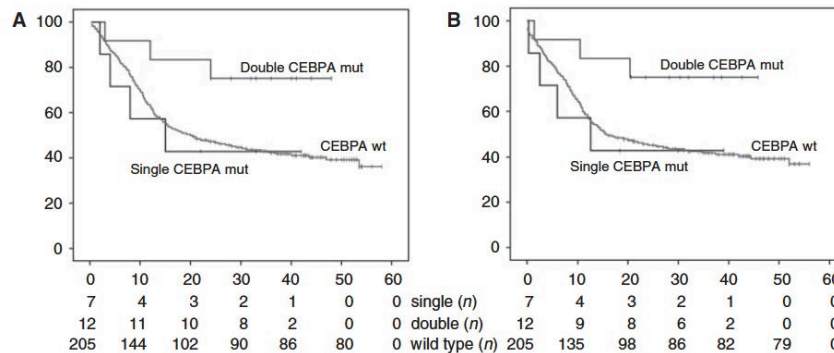


Figure 2-21 Survie globale et survie sans événement des patients avec une leucémie aiguë myéloïde selon la mutation de *CEBPα* (102)

(A) Survie globale des patients avec leucémie aiguë myéloïde sans mutation de *CEBPα* (wt ; n : 205) avec une seule (n : 7) et avec la combinaison des mutations *CEBPα* C et N-terminale (double ; n : 12). Axe des abscisses : mois ; axe des ordonnées : la probabilité de survie. (B) Survie sans événement des patients avec leucémie aiguë myéloïde sans mutation de *CEBPα* (wt ; n : 205) avec une seule (n : 7) et avec la combinaison des mutations *CEBPα* C et N-terminale (double ; n : 12) (102)

La duplication en tandem du gène *MLL* est la première altération moléculaire identifiée comme ayant un rôle sur l’évolution clinique des patients au caryotype de pronostic intermédiaire. *MLL*-PTD contribue à la leucémogénèse via l’hyperméthylation de l’ADN et la régulation épigénétique des gènes suppresseurs de tumeur. Détectée dans 5 à 10% des cas, l’anomalie *MLL*-PTD est retrouvée dans 30 à 40% des cas avec la mutation *FLT3* associée à une durée de rémission complète plus courte (66,67,95,96).

La mutation de *KIT* est trouvée dans 25 à 30% des cas de LAM à caryotype normal (66). La mutation de *KIT* confère un mauvais pronostic (54,103). A noter que l’hyperexpression de *KIT* est souvent associée aux LAM CBF et par conséquent à rechercher comme potentiel cible thérapeutique. Néanmoins, l’impact pronostique est controversé. L’analyse du protocole LAM CBF du GOELAMS ne montre pas en analyse multivariée d’impact de mutation du gène *KIT* sur la survie sans événement et la survie globale des patients alors que le suivi de la maladie résiduelle par RT-qPCR montre un impact négatif si la décroissance est inférieure à 3 log après la première consolidation (66,104,105).

D'autres mutations récurrentes, plus rares, parmi lesquelles figurent : *RAS*, *IDH1*, *IDH2*, *WT1* ont été identifiées mais leur impact pronostique est encore à l'étude (66). Encore, les mutations de *RUNX1* dans le domaine Runt sont associées aux LAM 0 indifférenciées et à un taux de survie médiocre (87,106).

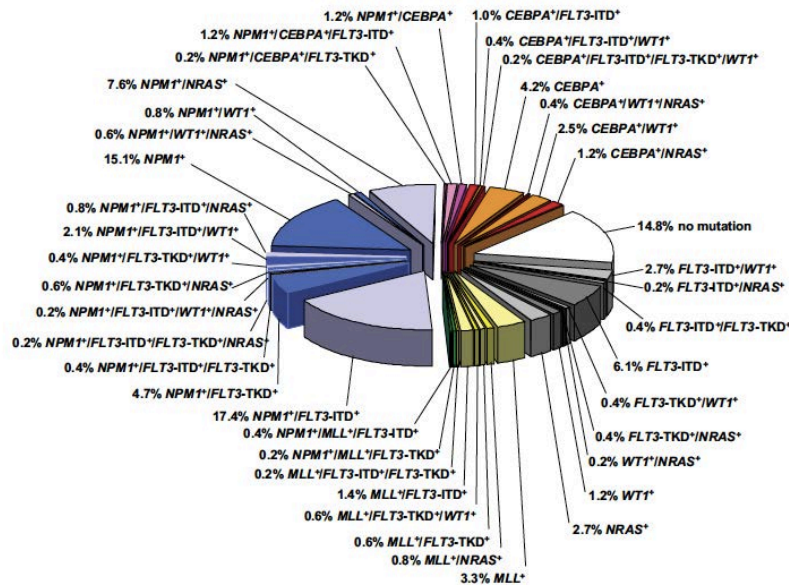


Figure 2-22 Graphique circulaire illustrant l'hétérogénéité moléculaire des leucémies aiguës myéloïdes à cytogénétique normale (54)

Basé sur les mutations des gènes *NPM1* (bleu), *CEBPA* (orange-rouge), *MLL* (jaune-vert), *FLT3-ITD* ou *TKD*, *NRAS* et *WT1*. Données issues d'une analyse de 485 jeunes adultes avec LAM à cytogénétique normale. Gris : sous groupe sans mutation hypothétique de classe II, Blanc : sous groupe sans mutation sur les gènes précédemment décrits (54)

En plus des altérations moléculaires des modifications dans l'expression de gènes spécifiques semblent avoir un rôle pronostique (54,66). *BAALC* est principalement exprimé au niveau des tissus de neurectoderme et dans les précurseurs hématopoïétiques (95). L'hyperexpression de *BAALC* (*brain and acute leukemia, cytoplasmic*), gène localisé en 8q22.3, a été identifiée dans les LAM avec trisomie 8 comme facteur prédictif d'un faible taux de rémission complète et d'une mauvaise survie (66,107). De la même manière, l'augmentation de l'expression des gènes *MN1* (*meningioma1*), *ERG* (*erythroblastosis virus E26 oncogene homolog, avian*) en 21q22 et *EVI1* (*ecotropic viral integration site 1*) s'accompagne d'un pronostique pauvre (66,108–110).

2.1.9.2.7 *Resistance multidrogue*

Le gène *MDR1* (*multidrug resistance*) est fréquemment exprimé dans les LAM secondaires et LAM du sujet âgé (70% des cas) (82). Un haut niveau d'expression de *MDR1* induirait une baisse de la concentration intracellulaire en chimiothérapie. Ce gène est donc associé à un

pronostic défavorable (111). Récemment, une étude chinoise (112) a mis en évidence que les faibles expressions concomitantes de *MDR1* et *BAALC* dans le groupe cytogénétique intermédiaire étaient associées à un pronostic favorable (figure 2-23).

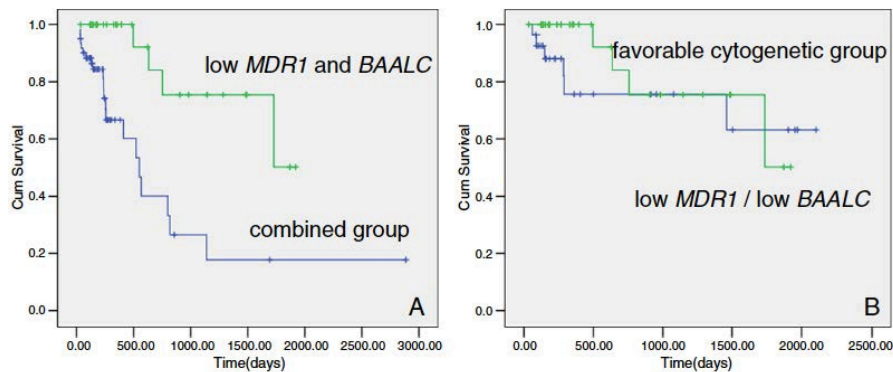


Figure 2-23 Impact de *MDR1* avec l'expression combinée de *BAALC* dans les LAM du groupe de risque intermédiaire (112)

- (A) Courbes de survie globale (OS) montrant un devenir favorable pour les patients ayant *MDR1* faible/*BAALC* faible comparé aux patients avec *MDR1* haut et/ou *BAALC* hautement exprimé. (B) Courbes de survie globale ne montrant pas de différence entre les patients *MDR1* faible/*BAALC* faible et le groupe de risque favorable (112).

2.1.9.2.8 La maladie résiduelle

Le monitoring de la maladie résiduelle est possible par RT-PCR (détection des transcrits de fusion, mutations génétiques et hyperexpression) ou par cytométrie en flux (identification des phénotypes aberrants). La cinétique de la baisse des transcrits *RUNX1-RUNX1T1* et *CBFβ-MYH11* a été corrélée à un risque de rechute (113). Plusieurs études montrent que la détection immunophénotypique de la maladie résiduelle après induction et consolidation constitue une information pronostique indépendante et intéressante (54,114). L'équipe de Kohlmann et al (115) montre que le séquençage des mutations de *RUNX1* en NGS (*next generation sequencing*) est un marqueur de suivi individuel de la maladie résiduelle. Cette découverte va contribuer à redéfinir de nouvelles catégories de risque.

2.1.10 Traitement

Sans traitement les leucémies aiguës sont mortelles en quelques semaines par complications hémorragiques et/ou infectieuses (23). La décision thérapeutique est prise en réunion de concertation pluridisciplinaire comportant des hématologues et des biologistes. La participation à des essais cliniques est conseillée après information et consentement éclairé du patient. L'arsenal thérapeutique se compose d'une chimiothérapie souvent intense selon un schéma induction pour obtenir la rémission complète, consolidation destinée à prévenir les rechutes et parfois, une phase d'entretien. Les facteurs de risque cytogénétiques et moléculaires sont pris en compte pour adapter la stratégie thérapeutique de la consolidation. La radiothérapie a peu d'indication dans les LAM. La greffe de cellules souches hématopoïétiques est une alternative. Enfin, les thérapies ciblées, finalité de l'amélioration des connaissances physiopathologiques des LAM, bouleversent l'évolution dans certains cas (51).

2.1.10.1 *Prise en charge du patient jeune*

Chez les sujets de moins de 60 ans le traitement intensif à visée curatrice est indiscutable. Le régime standard de la chimiothérapie d'induction associe une anthracycline et de la cytarabine (agent cytostatique), c'est le schéma «3+7» (figure 2-24). La phase d'aplasie médullaire post chimiothérapie impose un isolement du patient en unité protégée (51,54).

La rémission complète, préalable, nécessaire à la survie à long terme, se définit par la correction de l'hémogramme (polynucléaires neutrophiles > 1 G/L ; plaquettes >100 G/L ; blaste <1%), la présence de moins de 5% de blastes dans la moelle osseuse, l'indépendance aux transfusions de globules rouges et la disparition de toutes les atteintes extra-médullaires présentes au diagnostic (51).

Par la suite, les patients doivent recevoir rapidement des cures de consolidation. La stratégie se détermine en fonction du risque cytogénétique. En cas de cytogénétique favorable, des cycles répétés de cytarabine haute dose sont recommandés. La greffe autologue ou allogénique n'a pas montrée davantage dans ce groupe. Pour les patients de la classe intermédiaire, les cycles de cytarabine sont couramment utilisés. Des preuves tendent à dire que la greffe allogénique pourrait être une bonne option pour les LAM à caryotype normal et marqueurs moléculaires défavorables (*NPM1* non muté avec mutation de *FLT3* ou *CEBPα* non muté) (99). Chez les patients du groupe défavorable, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques apparentée doit être systématiquement proposée (54). Le conditionnement est à base de fortes doses de cyclophosphamide couplées à un radiomimétique (le busulfan) ou à une irradiation. Il n'y a pas d'argument recommandant

une phase d'entretien pour les patients jeunes ayant reçu une consolidation et une intensification.

2.1.10.2 *Prise en charge du patient âgé*

Pour les sujets de plus de 60 ans, il est impératif d'évaluer d'une part les éléments pronostic péjoratifs (cytogénétique défavorable, caractère secondaire de la LAM...) et d'autre part la capacité de tolérance aux traitements intensifs (comorbidités). Les patients aptes à recevoir une chimiothérapie suivront un schéma d'induction similaire à celui de l'adulte jeune (figure 2-22). Le taux de rémission varie de 50 à 70%. La chimiothérapie de consolidation peut s'avérer problématique et n'a pas montré de supériorité par rapport à une chimiothérapie d'entretien prolongée à base d'anthracycline. La greffe allogénique à conditionnement atténué peut être proposée jusqu'à 65 ans et plus. Les sujets contre indiqués au traitement intensif peuvent se voir proposer de la cytarabine faible dose avec un taux de rémission plus faible oscillant de 15 à 20%. En dernier recours, un traitement de confort peut être instauré avec support transfusionnel, agents anti-infectieux et chimiothérapie palliative chez les patients trop âgés ou de très mauvais pronostic (51,54).

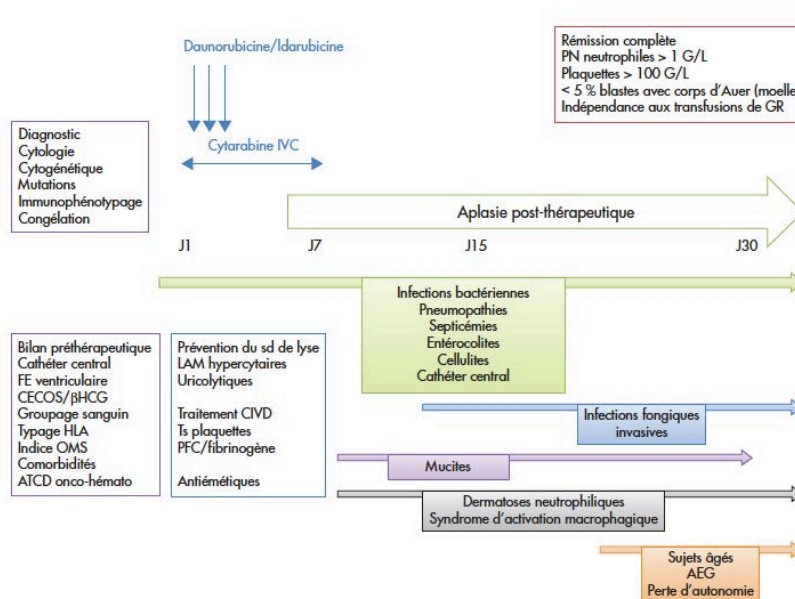


Figure 2-24 Déroulement du traitement d'induction (51)

2.1.10.3 *Prise en charge en situation de rechute*

La rechute est déterminée par la réapparition d'au moins 5% de blastes dans la moelle osseuse (chez un patient ayant obtenu une rémission complète préalable) ou par la preuve histologique d'un syndrome tumoral extra médullaire. La détection des transcrits de fusion

ou d'anomalie cytogénétique signe la rechute moléculaire. Cette dernière, à l'heure actuelle, n'est pas recommandée d'être traitée. Les rechutes précoces survenant à moins d'un an de la rémission complète sont de pronostic redoutable. A ce stade, la balance bénéfique/risque est impérative à estimer. Le manque d'études contrôlées évaluant les différents traitements dans les rechutes de LAM induit l'absence de protocole standard. Pour les patients jeunes n'ayant pas été greffés, une chimiothérapie à base de cytarabine hautes doses suivie directement par une consolidation par allogreffe peut être proposée. La participation à des essais cliniques testant de nouvelles molécules peut être envisagée si les molécules évaluées ciblent les anomalies moléculaires identifiées. Il existe un score pronostique permettant d'aider au choix de la prise en charge (tableau 2-9) (51,54).

Tableau 2-9 Score pronostic à la première rechute (51)

Facteurs pronostiques à la rechute		Risque pondéré		
Durée de première rémission				
> 18 mois		0		
7-18 mois		3		
≤ 6 mois		5		
Cytogénétique au diagnostic				
Inv16 ou t(16;16)		0		
t(8;21)		3		
Autres		5		
Âge				
≤ 35 ans		0		
36-45		1		
> 45 ans		2		
Auto- ou allogreffe avant première rechute				
Non		0		
Oui		2		
Groupe de risque (% de patients)	Score	RC2	Survie	
			1 an	5 ans
Favorable (9 %)	0-6	85 %	70 %	46 %
Intermédiaire (25 %)	7-9	60 %	49 %	18 %
Défavorable (66 %)	10-14	34 %	16 %	4 %

2.1.10.4 *Prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes thérapie induites*

Les données de traitement sont pauvres puisque les patients présentant des LAM secondaires sont souvent exclus des essais cliniques. Cependant, l'attitude thérapeutique préférable reste les protocoles classiques (association anthracycline et cytarabine) la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Ici encore, il faut prendre en compte le statut du cancer primitif, le performans status du patient ainsi que le caryotype leucémique. Dans certaines séries, la survie atteint 20 à 30%.

2.1.10.5 *Le cas particulier des leucémies aiguës promyélocyaires (LAM 3)*

Entité physiopathologique associée à un tableau clinique, cytologique et moléculaire particulier. Dans 90% des cas la LAM3 se présente accompagnée d'un syndrome hémorragique lié à une coagulation intravasculaire disséminée. Le caryotype retrouve dans

plus de 95% des cas la translocation t(15;17)(q24;q21) qui induit la fusion des gènes *PML* (15q24) et *RAR α* (17q21) formant le transcrite oncogénique PML-RAR α . PML-RAR α est un inhibiteur fort de la différenciation cellulaire ce qui explique que l'acide-tout-transrétinoïque (ATRA), à dose pharmaceutique, lève l'inhibition. La différenciation des blastes vers le stade de polynucléaires reprend alors. Le trioxyde d'arsenic, autre molécule thérapeutique, dégrade le complexe PML-RAR α pour induire la différenciation et détruire les cellules leucémiques. La LAM promyélocytaire est donc l'exemple même du traitement par thérapie ciblée et nécessite une prise en charge urgente. Dès la confirmation diagnostique, l'induction par anthracycline et ATRA est débutée. Durant cette période, le syndrome de différenciation provoqué par la libération de cytokines pro-inflammatoires lors du processus de maturation doit être prévenu par de la dexaméthasone. Le traitement de consolidation se compose de 2 ou 3 cures d'ATRA couplées à une anthracycline. L'entretien, délivré sur une période de 2 ans est à base d'une chimiothérapie orale faible dose et ATRA. Le pronostic est excellent, l'allogreffe n'a pas de place en première rémission. La rechute est traitée par trioxyde d'arsenic possiblement associée à de l'ATRA et/ou à l'idarubicine (51).

2.1.10.6 Les thérapies ciblées

Les progrès dans la connaissance de la leucémogénèse ont permis de développer une approche par thérapie ciblée. De nombreuses cibles s'ouvrent à ces thérapeutiques comme la voie de transduction du signal, les gènes de fusion ou mutations modifiant l'activité transcription, les gènes impliqués dans la navette nucléo-cytoplasmique et des protéines de surface. Exemples de 3 modalités thérapeutiques ayant atteint la phase III des essais cliniques (54):

- Les anticorps anti CD33 couplés à un agent cytotoxique inhibant la synthèse d'ADN et induisant l'apoptose. Le gemtuzumab ozogamicin est approuvé pour le traitement des LAM en rechutes du sujet âgé.
- Les inhibiteurs de tyrosine kinase sélectifs de FLT3. Le sunitinib et le lestaurtinib peuvent être utilisés dans les LAM FLT3 mutées en rechute où ils induisent une baisse transitoire des blastes dans le sang et la moelle.
- Les agents déméthylant : Deux analogues de la cytosine, azacitidine et decitabine ont été approuvés dans le traitement des syndromes myélodysplasiques. En essai de phase III randomisé sur des patients classes intermédiaires ou haut risque développant une LAM secondaire l'azacitidine améliore la survie à 2 ans à 50% au lieu de 16% avec les traitements conventionnels.

2.2 Leucémies aiguës thérapies induites

On décrit deux types de leucémies aiguës myéloïdes thérapies induites (t-AML) selon les molécules thérapeutiques préalablement employées (tableau 2-10):

- Hémopathies myéloïdes secondaires à un traitement alkylant (cyclophosphamide par exemple) ou à une irradiation survenant 5 à 6 ans après l'exposition. Ces LAM présentent des signes de dysplasie sur plusieurs lignées et sont caractérisées par des monosomies et/ou délétions des bras longs des chromosomes 5 et 7 voir des caryotypes complexes.

- Hémopathies myéloïdes secondaires au traitement par un inhibiteur de la topo-isomérase II (anthracyclines et epipodophyllotoxine) avec un délai d'apparition inférieur à 2 ans. Une composante monocytaire caractérise ces LAM. On retrouve communément des translocations équilibrées impliquant le bras long des chromosomes 11 et 21 impliquant les gènes *MLL* (11q23) (116) et *RUNX1* (21q22) respectivement. La morphologie est alors semblable à la cytologie des leucémies de novo associées à ces anomalies chromosomiques.

Dans son étude internationale incluant 511 cas de t-LA et t-SMD dont 79 présentant une anomalie équilibrée impliquant le 21q22, M.L.Slovak (117) observe 44 cas de t-LA/t-SMD associés à la translocation t(8;21)(q22;q22) parmi lesquels 13 patients avaient été traités préalablement pour un cancer du sein.

Tableau 2-10 Caractéristiques biologiques et cliniques des cas de t-LAM associées aux agents alkylants et aux inhibiteurs de topoisomérase II (118)

	TOP2 poison * associated (* such as etoposide, teniposide mitroxantrone, epirubicin)	Alkylating agent § associated (§ such as cyclophosphamide, melphalan, chlorambucil, and nitrosoureas)
Latency period	Short, <2 years	2–8 years
Chromosome abnormalities	Recurrent translocations especially involving <i>MLL</i> at 11q23 and t(15;17)(<i>PML-RARα</i>), t(8,21)(<i>AML-ETO</i>)	Deletions involving Chr 5 and 7
Complex Karyotype	Rare	Frequent
Preceded by myelodysplastic syndrome	Rare	Frequent
Age association	Younger	Older

Ces leucémies sont la conséquence d'évènements mutationnels induits par les chimiothérapies. Plusieurs études ont cherché à identifier des facteurs de prédisposition en étudiant la pharmacogénétique et les mécanismes de réparation de l'ADN (119). Un déficit

dans les voies du système *mismatch repair* (MMR) semble être un facteur de susceptibilité de t-LAM. En revanche, les autres voies de réparation de l'ADN, de détoxification et d'autres facteurs potentiels ont montré des résultats contradictoires. Différentes voies génétiques et de coopérations mutationnelles semblent concernées dans la pathogénèse.

Au niveau moléculaire, les t-LAM et t-SMD dévoilent un fort taux de mutations du gène *TP53*. On retrouve aussi une fréquence élevée d'altérations des gènes *FLT3* et *NRAS/KRAS* dans les t-LAM. Les mutations *KIT* et *ASLX1* sont souvent associées aux t-LAM avec t(8;21)(q22;q22) (120).

Les topoisomérases II (Top2) sont des enzymes qui régulent la topologie de l'ADN pour rendre la chromatine accessible. Ces enzymes sont essentielles à la survie cellulaire et ont un rôle dans les processus de régulation, transcription, apoptose, condensation et ségrégation chromosomique. Un homodimère de Top2 casse un brin d'ADN puis secondairement en casse un deuxième sur le brin opposé à quelques bases d'intervalle. Un intermédiaire de réaction se forme au moment où un seul brin d'ADN se lie de manière covalente à l'enzyme : c'est le complexe de clivage (figure 2-25). Ce mécanisme est normalement toléré et contrôlé (118).

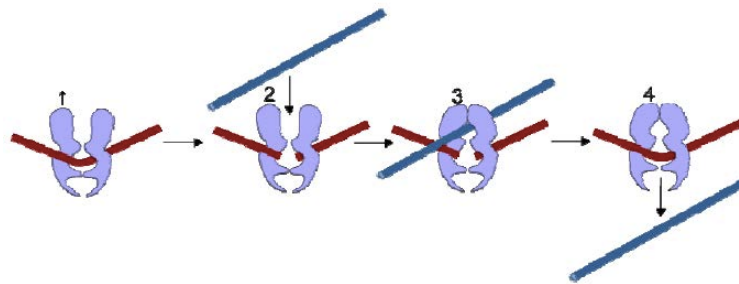


Figure 2-25 Mécanisme des topoisomérases II (118)

Les topoisomérases II clivent les 2 brins d'un segment d'ADN (1-2). Un deuxième duplex d'ADN passe à travers l'enzyme (3-4). Le premier duplex est relié et les produits se détachent de l'enzyme (4) (118)

Les agents alkylants interagissent chimiquement avec l'ADN pour former des liens de croisements inter-brins avec de l'ADN additionnel. Les inhibiteurs de Top2, en revanche, stabilisent les complexes de clivage. Ils empêchent donc la résolution des brins par ligature. Les cassures doubles brins d'ADN (DSBs, DNA double-strand breaks) s'accumulent donc dans le noyau. Une grande quantité de DSBs déclenche un signal d'apoptose amenant à la mort cellulaire. C'est le but des thérapies anti-cancéreuses (118).

L'implication du complexe ADN/Top2 dans les translocations a été étudiée. Les translocations pourraient être la conséquence d'échange de matériel entre 2 monomères d'ADN/Top2 suivi d'une ligature. L'exemple le mieux connu concerne les translocations de *MLL*. Les sites de clivage des Top2 sont souvent à l'intérieur ou près des points de cassure

des réarrangements de *MLL* dans les t-LAM. De plus, l'étude des points de cassure au sein de *MLL* dans les leucémies aiguës de novo et dans les t-LAM montre que ces deux classes ont des mécanismes de genèse des translocations différents. En effet, Broeker et al, a cartographié les localisations des points de cassure dans le fragment *BamHI* de 8.3 kb du gène *MLL*. Il a mis en évidence une cassure préférentielle dans la portion 5' (exons 9 et 10) du fragment pour les leucémies aiguës de novo tandis que les remaniements de l'extrémité 3' (exon12) sont majoritaires dans les t-LAM (121). Au niveau de cette région télomérique se trouve une zone d'hypersensibilité à la DNase I et un promoteur cryptique CTCF (122). Ces aires ont été aussi associées avec des régions de cassures d'autres gènes réarrangés dans les t-LAM comme *RUNX1* et *RUNX1T1*. Il est donc suggéré qu'une structure inhabituelle de la chromatine est nécessaire à la contribution des translocations des t-LAM (118,123). Plus récemment Cowell et al (118) émet l'hypothèse que la Top2B induirait les DSBs à l'origine des remaniements chromosomiques.

2.3 RUNX1

RUNX1 est un des gènes les plus fréquemment dérégulé dans les leucémies notamment au travers de translocations. La plus connue est la t(8;21)(q22;q22) décrite pour la première fois en 1973 qui crée une protéine chimérique RUNX1-RUNX1T1. L'étude moléculaire des translocations a permis de découvrir en 1999 l'implication de mutations hétérozygotes germinales de *RUNX1* dans une pathologie plaquettaire familiale prédisposant aux leucémies aiguës myéloïdes. Par la suite, d'autres points de mutations au sein du gène ont été identifiés et associés au développement de leucémies de novo de type indifférenciées M0, de syndromes myélodysplasiques et de leucémies secondaires. Le gène *RUNX1* est donc une clé majeure de l'hématopoïèse et de la mécanique leucémique.

2.3.1 Noms, localisation et structure

Runt-related protein 1 (RUNX1) est un gène de 260 kilobases localisé sur le chromosome 21 en 21q22.12. Il est aussi connu sous les dénominations de *acute myeloid leukemia 1 (AML1)*, *polyoma virus enhancer-binding protein 2alphaB (PEBP2αB)* ou encore *core-binding factor alpha (CBFα)*. *RUNX1* comporte 12 exons et deux promoteurs situés dans les exons 1 et 3 respectivement (124). En conséquence, *RUNX1* possède plusieurs isoformes dont les trois principaux sont RUNX1a, RUNX1b et RUNX1c et tous possèdent le *Runt domain* (figure 2-26). Ces différents isoformes jouent chacun un rôle spécifique dans les cellules souches et la régulation de l'hématopoïèse embryonnaire (125). Ce gène appartient à la famille des gènes à *Runt domain* (exons 2; 3 et 4) et code pour la sous unité alpha du facteur de transcription CBF. Chez les mammifères la famille des protéines Runt se compose de trois gènes : *AML1/RUNX1*, *AML2/RUNX3* en 1p36 et *AML3/RUNX2* en 6p21. A l'âge adulte, *RUNX1* et *RUNX3* sont exprimés dans le système hématopoïétique tandis que *RUNX2* est un régulateur de l'ostéogénèse (124).

La protéine RUNX1 se compose de trois domaines distincts (figure 2-26):

- Le domaine Runt (RHD) motif protéique de 128 acides aminés, hautement conservé, qui possède des capacités de liaison à l'ADN et d'hétérodimérisation avec la sous-unité beta du CBF. Runt interagit avec les facteurs de transcription co-activateurs p300-CBP. Le Runt domain est une région homologue à une protéine initialement décrite chez la *Drosophila melanogaster* impliquée dans la latéralisation, la différenciation sexuelle et le développement neural (125). Il est situé en partie N-terminale.
- Le domaine d'activation et de transcription (TAD) en C-terminal présente un signal d'adressage nucléaire composé de 31 acides aminés NMTS (126,127).

- Le domaine de répression situé en toute extrémité C-terminale est composé aussi d'une séquence conservée de 5 acides aminés VWRPY qui coordonne le complexe répresseur Groucho/TLE dépendant (126).

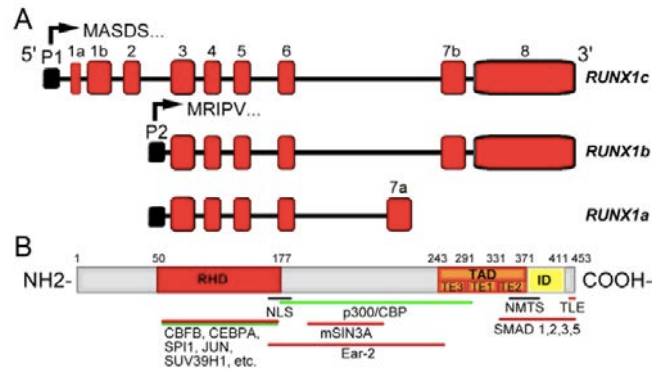


Figure 2-26 Représentation schématique des transcrits de RUNX1 et de sa protéine (128)

(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 ; TE1 à 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 (128)

Dans les exons 1, 5 et 6 des hautes densités de séquences répétées Alu ont été décrites (124). Les séquences Alu sont des séquences répétitives d'environ 300 paires de bases, riches en CG. Plusieurs données indiquent que ces séquences seraient impliquées dans des événements recombinants. En effet, la majorité des points de cassure de RUNX1 ont lieu au niveau d'introns comportant des séquences Alu.

Une région de 555 paires de bases appelée FLRX1 dans l'intron 4 de *RUNX1*, dans la région de cassure de la t(8;21)(q22;q22) montre un haut degré similitude avec une région intronique du gène *FLI1* localisé sur le chromosome 11. *FLI1* participe à la translocation t(11;22) qui génère le transcrit EWS/FLI1 retrouvée dans le sarcome d'Ewing. En étudiant les séquences de FLRX1 et *FLI1*, de même que les régions qui les entourent, Levanon (124) émet l'hypothèse que FLRX1 serait une séquence dérivée de *FLI1* incorporée dans *RUNX1*.

De plus, RUNX1, est une protéine qui subit de nombreuses modifications post traductionnelles. In vitro, la phosphorylation de RUNX1 contribue à sa fonction d'activateur de la transcription en réduisant son interaction avec des répresseurs comme mSin3A. La méthylation, inversement, augmente la réaction avec mSin3A et donc provoque la transcription de gènes cibles tel *PU.1* (facteur de transcription critique dans la différenciation myéloïde). Cependant, aucune étude in vivo ne confirme la mission et l'importance de ces changements post traductionnels (126).

2.3.2 Rôles

RUNX1 est un facteur de transcription. Le complexe PEBP2/CBF se constitue de la sous unité α (RUNX1) qui se lie à l'ADN et de la sous unité β : PEBP2 β /CBF β , dépourvue de capacité de liaison à l'ADN. A travers cette liaison, RUNX1 peut réguler l'expression de gènes spécifiques de l'hématopoïèse. Les gènes cibles concernent des facteurs de croissance (GM-CSF, MPO, IL-3), les récepteurs de surface des cellules lymphoïdes T et B, des molécules de signalisation (CDKN1A, BLK, BCL2) ainsi que des activateurs de la transcription (STAT3). RUNX1 peut agir comme un activateur ou un répresseur selon ses interactions moléculaires (figure 2-27). De plus, l'hétérodimérisation avec la sous unité β protège RUNX1 de la dégradation par le protéasome (127).

La protéine RUNX1 est essentielle à l'hématopoïèse normale (figure 2-28). Des expériences sur des souris homozygotes (*knockout mice*) déficientes en *RUNX1* montrent un décès à 12,5 jours de vie embryonnaire par absence d'hématopoïèse hépatique et de formation de cluster de cellules souches hématopoïétiques. Cependant, l'expression continue de RUNX1 à l'âge adulte n'est pas nécessaire au maintien des cellules souches hématopoïétiques. En effet, l'excision du locus de *RUNX1* chez des souris adultes ne provoque pas un échec dans l'hématopoïèse. D'autres études sur les *knockout mice* démontrent que RUNX1 régule le nombre de cellules souches au stade adulte. La transplantation de RUNX1 tronqué chez des souris adultes irradiées provoque la prise de greffe hématopoïétique alors que l'expression forcée de RUNX1 entraîne la perte de fonction des cellules souches hématopoïétiques (17,125).

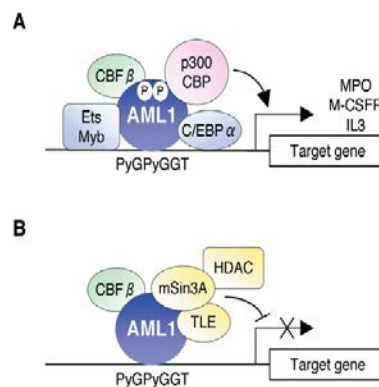


Figure 2-27 Formation du complexe de transcription par RUNX1/AML1 (125)

(A) AML1 se lie à la séquence d'ADN PEBP2. La séquence PEBP2 est adjacente pour lier d'autres sites de liaison des protéines (Ets, Myb, CEBP α). AML1 régule l'expression de gène en coopérant avec des facteurs de transcription spécifique de lignée. AML1 régule l'activation (A) ou la répression (B) l'activité transcriptionnelle par le recrutement de co-activateurs (p300/CBP) ou co-répresseurs (mSin3A, HDAC et TLE). L'action de AML1 comme activateur ou répresseur peut être déterminée par différents facteurs dont la phosphorylation de AML1 (125)

De la même manière, RUNX1 est indispensable à la mégacaryopoïèse. Les knockout mice présentent une thrombopénie non létale. Récemment, des cibles potentielles de RUNX1 impliquées dans la maturation plaquettaire ont été identifiées. Ainsi, RUNX1 inhiberait le promoteur de *P19^{ink4d}* diminuant la polyploïdisation des mégacaryocytes. L'interaction de RUNX1 avec les gènes *MYH9* et *MYH10* (chaines lourdes de la myosine) régulerait le phénomène d'endomitose. Aussi, l'expression de l'enzyme 12-lipoxygénase, codée par le gène *ALOX12*, et qui catalyse la transformation de l'acide arachidonique est abaissée en présence de RUNX1. *ALOX12* est donc une cible directe de RUNX1 (17). L'élucidation du rôle de *RUNX1* dans le développement mégacaryocytaire permet d'expliquer l'association décrite dès 1985 entre la pathologie plaquettaire familiale autosomique dominante (FDP) et les mutations constitutionnelles du gène *RUNX1* (15).

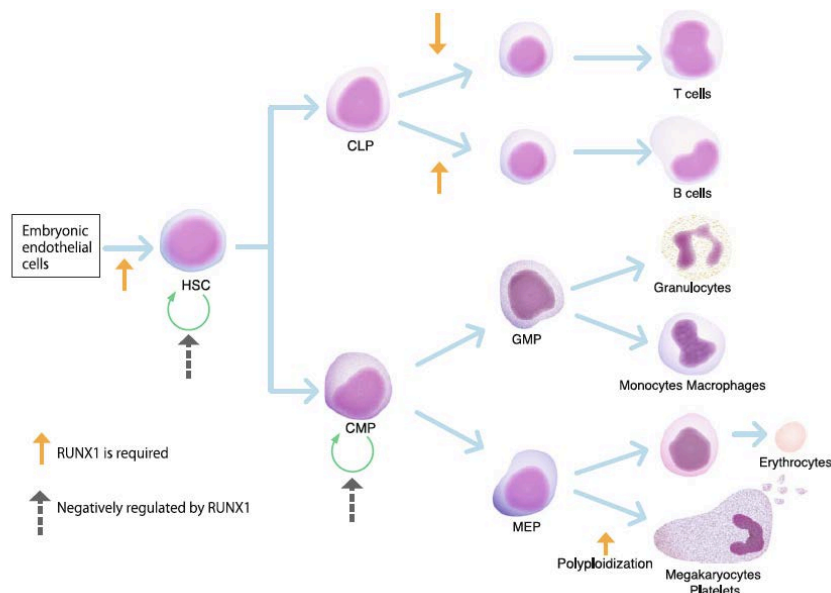


Figure 2-28 Régulation des cellules hématopoïétiques et différenciation des cellules hématopoïétiques par RUNX1 (17)

CLP : progéniteur lymphoïde commun, CMP : progéniteur myéloïde commun, GMP : progéniteur macro-granulocyttaire, MEP : progéniteur érythro-mégacaryocytaire (17)

2.3.3 RUNX1 dans la leucémogénèse myéloïde

Les principaux modes de dérégulation du gène *RUNX1* sont les translocations, les mutations ponctuelles et les amplifications.

2.3.3.1 Translocations : effet dominant négatif

Les translocations chromosomiques avec formation de gènes chimériques ont été les premières altérations de *RUNX1* décrites. Plus de trente gènes partenaires seraient impliqués dans ces translocations mais peu ont été identifiés (129,130).

2.3.3.1.1 Translocation *t(8;21)(q22;q22)*

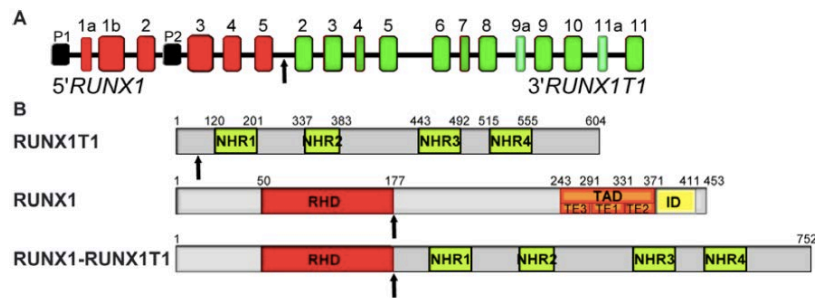


Figure 2-29 Représentation schématique du gène de fusion RUNX1-RUNX1T1, des protéines sauvages RUNX1T1 et RUNX1 et de la chimère de fusion RUNX1-RUNX1T1 (128)

(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 RUNX1T1 et RUNX1 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 (128)

L'anomalie est retrouvée associée au sous type LAM 2 (FAB) où elle est détectée dans 40% des cas. Cette translocation entraîne la fusion du gène *RUNX1* (21q22) avec le gène *RUNX1T1* (8q22) (figure 2-29). La protéine chimérique RUNX1-RUNX1T1 se constitue de 752 acides aminés. Elle est composée de la quasi totalité de la protéine RUNX1T1 (aussi nommée ETO) et de la portion N-terminale de RUNX1 contenant le domaine Runt (126). La protéine RUNX1T1 ne possède pas la capacité de se lier à l'ADN, mais elle se caractérise par ses quatre régions *Nervy homology region* (NHRs) semblables à celles de la Drosophile. Chez cette dernière, les NHRs s'expriment dans le système nerveux central et dirigent la croissance axonale (126). En conséquence de la translocation, le domaine des NHRs est la partie de RUNX1-RUNX1T1 qui coopère avec les protéines co-répressives Ncor, mSin3A, SMRT et HDACs (figure 2-30) (129).

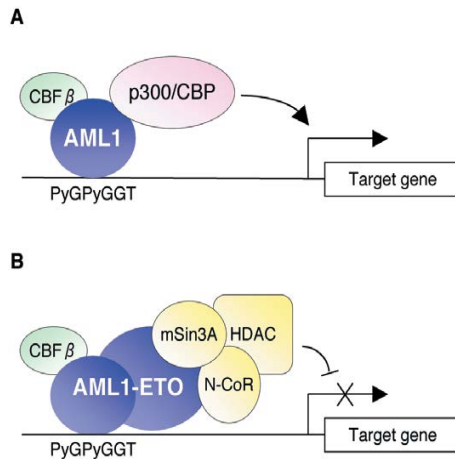


Figure 2-30 Recrutement répressur par AML1-ETO (RUNX1/RUNX1T1) (125)

En conséquence de la t(8;21)(q22;q22) AML1 est coupé entre le domaine Runt et le domaine de trans-activation. Bien que AML1 natif active l'expression de gènes cibles (A), AML1-ETO interfère via la liaison de AML1 à l'ADN et recrute des complexes transcriptionnels qui contiennent N-COR, mSinA et HDAC (B). Ces complexes répriment l'expression de gènes normalement régulé par le complexe AML1 natif (125)

Les premiers modèles animaux avec insertion homozygote du gène de fusion RUNX1-RUNX1T1 ont montrés une mort précoce embryonnaire identique aux knockout mice. Cependant, les cellules de souris hétérozygotes pour RUNX1-RUNX1T1 sont capables de se différencier en macrophages et cellules dysplasiques myéloïdes, contrairement aux homozygotes qui ne présentent aucune hématopoïèse. RUNX1-RUNX1T1 agit donc comme un régulateur dominant négatif de RUNX1 (126). De plus, RUNX1-RUNX1T1 possède une affinité plus grande pour le CBFβ que RUNX1 natif. Donc, à travers l'inhibition de la fonction normale de RUNX1, RUNX1-RUNX1T1 réprime l'expression de gènes spécifiques de la lignée myéloïde et par conséquent bloque la maturation des cellules myéloïdes. La mutation de *RUNX1* dans ce cas s'apparente à un évènement de classe II dans le modèle de Gilliland (17).

D'autres modèles murins ont décrit la capacité de RUNX1-RUNX1T1 à modifier l'hématopoïèse adulte par action sur les cellules souches en créant un environnement favorable à la leucémie au travers d'acquisition de mutations additionnelles sur d'autres gènes. Les cellules souches hématopoïétiques prolifèrent lors de la perte de RUNX1. Ici, la mutation de *RUNX1* est un évènement de classe I dans le modèle de Gilliland (17,126).

Chez les souris l'expression de RUNX1-RUNX1T1 n'est pas suffisante au développement de la leucémie. Une mutation « second hit » est nécessaire. Mais il a été démontré que des isoformes tronquées de RUNX1-RUNX1T1, avec perte de la partie C-terminale, pouvaient générer à elles seules une leucémie aiguë myéloïde (126).

Quelques mutations « second hit » ont été identifiées grâce à l'utilisation de souris BXH2. On trouve parmi ces mutations, les gènes de la famille Ras, mais aussi ceux de récepteurs tyrosine kinase Kit et FLT3 (17).

La protéine RUNX1-RUNX1T1 conservant son domaine Runt, il est généralement admis que les gènes cibles soient identiques à ceux de RUNX1. Ainsi, RUNX1-RUNX1T1 régulerait, entre autres, la répression du gène suppresseur de tumeur $p14^{Arf}$, le *nerve growth factor* (NGF) et le régulateur de cycle cellulaire $p21^{WAF1}$. Par étude du transcriptome de lignées cellulaires, a été mis en évidence une inhibition des gènes de réparation de l'ADN parallèlement à l'activation des gènes d'auto-renouvellement cellulaire comme ceux de la voie NOTCH (126). D'un autre côté RUNX1-RUNX1T1 interagit avec les histones déacétylases HDAC-1, HDAC-2 et HDAC-3 pour bloquer la différenciation myéloïde. L'action d'inhibiteurs des HDAC permet de lever ce blocage et ouvre une perspective thérapeutique. De la même manière, le recrutement de l'ADN méthyltransférase par la protéine de fusion encourage la méthylation de l'ADN et aurait un effet synergique avec l'interaction des gènes de répression cibles (126).

2.3.3.1.2 *Translocation t(3;21)(q26;q22)*

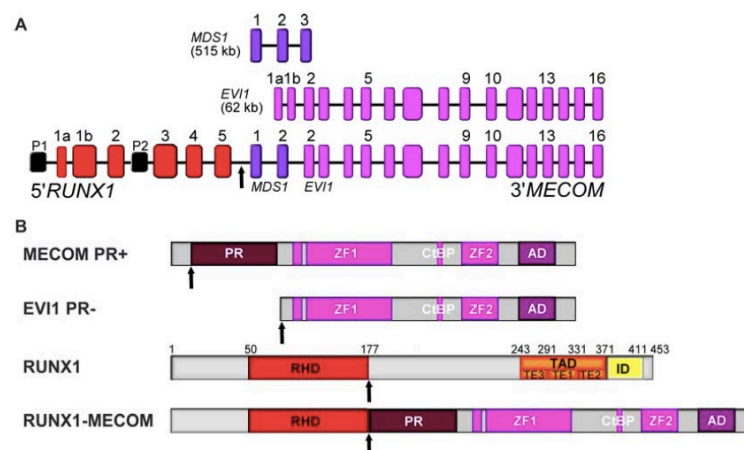


Figure 2-31 Représentation schématique des gènes MDS1 et EVI1 sauvages, du gène de fusion RUNX1-MECOM/MDS1-EVI1, des protéines MECOM, EVI1 et RUNX1 sauvages et de la chimère de fusion RUNX1-MECOM (128)

(A) Représentation des gènes MDS1 (3 exons, 515 kb) et EVI1 (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-EVI1 (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 (128)

Ici, le gène *RUNX1* casse entre le domaine Runt et la région TAD pour fusionner avec le gène *EVI1* situé sur le bras long du chromosome 3 (figure 2-31). La fusion RUNX1-EVI1 a été initialement identifiée dans la phase blastique des leucémies myéloïdes chroniques. *EVI1* code pour une protéine nucléaire formée de domaines zinc qui a la capacité d'induire la croissance et de bloquer la différenciation de certains types de cellules. Par exemple,

l'expression forcée de *EVI1* bloque la différenciation granulocytaire des cellules myéloïdes ou encore *EVI1* antagonise l'effet du TGF- β (inhibiteur de la croissance cellulaire). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle de RUNX1-EVI1 dans la leucémogénèse. L'hypothèse principale implique la partie de EVI1 incluse dans la protéine de fusion qui interagit avec la portion C terminale de la protéine de liaison CtBP. De plus, l'affinité de RUNX1-EVI1 pour CtBP est plus importante que celle de l'allèle *RUNX1* normal (125). Il en résulte un effet dominant inhibiteur identique à celui décrit avec la protéine de fusion RUNX1-RUNX1T1.

2.3.3.1.3 *Translocation t(16;21)(q24;q22)*

Ce réarrangement est peu fréquent et a été rapporté dans 20 cas de LAM dont 3 pédiatriques (131). Dans plus de la moitié des cas décrits les LAM étaient secondaires à des thérapies par inhibiteurs de topoisomérase II pour des cancers solides (132). Au niveau cytologique ces leucémies sont proches des LAM2 avec t(8;21) qui impliquent *RUNX1T1/ETO/MTG8*. La translocation crée le transcrite de fusion RUNX1-CBFA2T3 (ou AML1-MTG16). Les points de cassure sont dans l'intron 5 du gène *RUNX1* et dans l'intron 4 ou 1 de *CBFA2T3*. Le domaine Runt de RUNX1 est conservé ainsi que les domaines NHR de CBFA2T3. Ce dernier code pour une protéine de la famille des MTG co-répresseur de transcription. L'homologie entre *MTG16* et *MTG8* sous entend que dans leurs fusions avec RUNX1 ils aient le même rôle. Ainsi, la protéine chimérique RUNX1-CBFA2T3 est capable de recruter des histones déacétylases pour réprimer l'expression des gènes cibles de RUNX1.

2.3.3.1.4 *Translocation t(12;21)(p13;q22)*

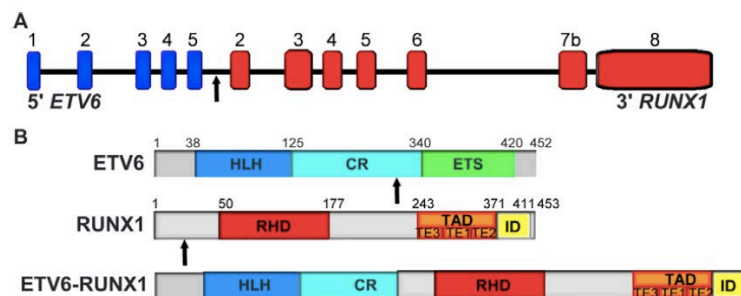


Figure 2-32 Représentation schématique du gène de fusion ETV6-RUNX1, des protéines sauvages ETV6 et RUNX1 et de la chimère de fusion ETV6-RUNX1 (128)

(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 «helixloop-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 (128)

Cette translocation entraîne la formation de la protéine de fusion ETV6-RUNX1. Dans la plupart des cas la jonction se fait entre l'exon 5 du gène *ETV6* dans la région 5' et le deuxième exon de *RUNX1* en 3' (figure 2-32). Dans cette translocation *RUNX1* conserve le domaine Runt et la région TAD, tandis que *ETV6* garde son promoteur et son domaine d'activation de la transcription. La protéine de fusion consécutive entretient la capacité de liaison avec les séquences cibles de *RUNX1* et a le potentiel de fonctionnement d'un répresseur HDAC dépendant qui dérégule les gènes cibles de *RUNX1*. Cette anomalie n'est pas détectable en cytogénétique conventionnelle et est retrouvée dans 25% des cas de leucémies aiguës lymphoïdes B de l'enfant (129).

⇒ Au total, la plupart des protéines de fusion avec *RUNX1* conservent l'extrémité N-terminale contenant le domaine Runt et perdent la région régulatrice C-terminale. Ces protéines chimériques ont une activité de régulation transcriptionnelle défailante mais gardent une capacité de liaison à l'ADN compétitive avec l'allèle *RUNX1* natif. L'effet dominant négatif est donc un mécanisme commun de leucémogénèse.

2.3.3.2 Mutations : perte de fonction et haploinsuffisance

Les mutations de *RUNX1* ont d'abord été décrites dans les leucémies myéloïdes indifférenciées (LAM 0) et les FDP/AML puis dans les syndromes myélodysplasiques. Les mutations *frame-shift* modifiant le cadre de lecture sont les plus fréquentes avec les mutations non-sens et faux sens suivies des altérations silencieuses. Certaines de ces altérations créent des protéines tronquées qui perdent leurs domaines de liaison à l'ADN et/ou leurs activités de transcription. Le plus souvent un seul allèle est touché. Toutes ces anomalies concernent les LAM du groupe cytogénétique intermédiaire et défavorable, elles ne sont pas retrouvées dans le groupe favorable (133).

2.3.3.2.1 Mutations constitutionnelles et Familial platelet disorder

Déjà décrit précédemment, la FDP/AML maladie autosomique dominante est le plus fréquemment associée à de larges délétions intragéniques à l'état hétérozygote ou à des mutations ponctuelles à l'état hétérozygote, dans la plupart des cas au sein du domaine Runt de *RUNX1*. L'haplo-insuffisance est la base de la pathogénèse, l'allèle fonctionnel restant produit une protéine en quantité insuffisante. Ces mutations constitutionnelles ne sont qu'une prédisposition leucémique.

2.3.3.2.2 Mutations acquises

Les mutations de *RUNX1* sont détectées dans plus de 40% des cas de LAM 0 (17). Dans les LAM secondaires les mutations de *RUNX1* sont retrouvées chez 10 à 20% des patients et ont une fréquence plus élevée dans les cas de LAM post radiothérapie ou thérapie induite.

En 1999, Osato et son équipe à travers l'étude de 160 LAM définissent quatre catégories de mutations toutes situées dans le domaine Runt (134). Parmi ces catégories une concerne les mutations bi-alléliques, entraînant l'absence complète de *RUNX1*, associées aux LAM indifférenciées (LAM 0). Cette association sera confirmée en 2000 par le travail de C.Preudhomme (135). Une autre catégorie, implique les mutations faux-sens hémizygotés. Dans ce cas, les mutants perdent leur capacité de liaison à l'ADN et de trans-activation bien que l'activité d'hétérodimérisation soit conservée. Dans ce cas, il y a un effet dominant négatif. Cette situation semble aussi observée dans les LAM thérapies induites ou les LAM progressives. En 2004, Osato retrouve les résultats antérieurs et met en évidence trois régions cibles du domaine Runt affectées par des mutations faux-sens (136). Ces régions correspondent aux boucles responsables de la liaison à l'ADN. De plus, Osato montre une distribution de mutations dans la région C-terminale de *RUNX1* caractéristique des LAM secondaires. Harada et al, montre que certaines mutations en C-terminale résultant de mutation frame-shift aboutissent à des protéines mutées plus longues que la protéine normale. Le mécanisme pathologique est alors plus proche de celui d'une protéine de fusion issue d'une translocation plutôt que celui d'une protéine tronquée.

Les conséquences fonctionnelles des mutations ponctuelles de *RUNX1* entraîne la plupart du temps une perte de fonction de la protéine *RUNX1* par altération de la capacité de liaison à l'ADN et/ou la capacité d'hétérodimérisation avec la sous unité β (tableau 2-11) (127,133).

Tableau 2-11 Altérations fonctionnelles des mutants *RUNX1* (127)

<i>RUNX1</i> mutants	Localization	Frequency (%) ^a	DNA binding	β -subunit interaction	Subcellular localization	Transcriptional activity	In vitro ubiquitylation	MLL binding	Type of mutant ^b
WT			+	+	N	+	+	+	N.A.
L29S	N-terminal	4.5	+	+	N	+	+	-	3
A33V	N-terminal	0.5	+	+	N	+	+	-	3
G42R	N-terminal	0.9	+	+	N	+	+	-	3
R49H	N-terminal	0.5	+	+	N	+	+	-	3
R49S	N-terminal	0.5	+	+	N	+	+	-	3
H58N	Runt domain	0.9	+	+	N	+	+	-	3
S67I	Runt domain	0.5	+	-	N	±	+	-	1b/3
S67R	Runt domain	0	+	-	N	±	+	N.A.	1b
W79C	Runt domain	2.7	+	+	N	-	+	+	1
A107P	Runt domain	0	±	±	N	-	N.A.	N.A.	1ab
L117P	Runt domain	0.5	±	+	N	-	±	N.A.	1a/2
T149A	Runt domain	0	+	+	N	+	+	N.A.	4
I150T	Runt domain	0.5	+	+	N/C	-	±	N.A.	1c/2
P156A	Runt domain	0.5	+	+	N/C	-	+	N.A.	1c
Q158H	Runt domain	0.5	+	-	N	±	+	N.A.	1b
I166T	Runt domain	0.5	+	+	N	±	+	N.A.	1
R174Q	Runt domain	11.3	- ^c	+ ^c	N/C	-	+	N.A.	1ac
E196G	C-terminal	0.5	+	+	N	+	+	N.A.	4
R223H	C-terminal	0.5	+	+	N	+	+	N.A.	4
Y260X	C-terminal	0	+	+	C	±	+	N.A.	1c

Functional consequences for the indicated mutants are shown: -, no or very weak; ±, weak; +, normal; N, nucleus; C, cytoplasm; N.A., not available. (1) Transcription-defective type. (a) DNA-binding-defective type. (b) β -interaction-defective type. (c) Nuclear localization-defective type. (2) Ubiquitylation-defective type. (3) MLL-binding-defective type. (4) Unclassified. ^aMutation frequencies for particular amino acids in missense mutants of leukemia patients are obtained from <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>. ^bClassification of mutants. ^cBased on previous studies.

Toutes ces mutations ont des conséquences biologiques différentes. Certaines entraînent une perte de fonction, d'autres un effet dominant négatif.

2.3.3.3 Amplification

L'amplification de gène est un autre mécanisme de dérégulation d'oncogènes décrit dans les tumeurs solides et dans les hémopathies. L'amplification du gène *RUNX1* se manifeste par des duplications en tandem intra-chromosomique ou par la présence de copies extra-chromosomiques sous la forme de chromosome en anneaux ou de « double minute » (135). Lorsque *RUNX1* est amplifié aucune mutation au sein du gène n'est observée. Cette anomalie est principalement reportée dans les LAL communes et pré-B de l'enfant et rarement dans les LAM. Les conséquences fonctionnelles de l'amplification de *RUNX1* et son rôle dans la leucémogénèse ne sont pas bien connus. Cependant, l'amplification de *RUNX1* entraîne une surexpression du gène. Des études sur les modèles murins montrent qu'un effet de dosage génique peut participer à la leucémogénèse (137). Robinson et al (138) explique le phénomène d'amplification intra-chromosomique de *RUNX1* par un mécanisme de cycle de *break-fusion-bridge* déjà décrit dans les tumeurs (figure 2-33). La perte d'un télomère serait l'événement initiateur du cycle d'amplification ce qui affecterait la stabilité du génome.

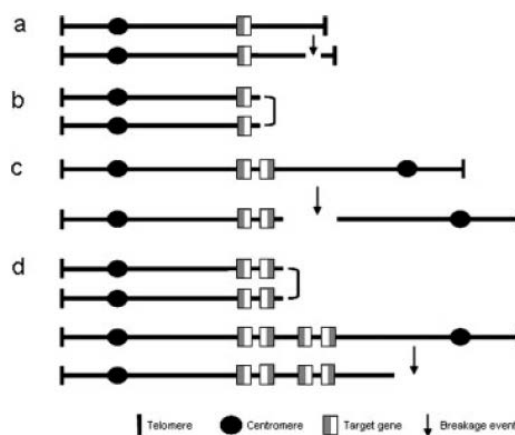


Figure 2-33 Représentation schématique du cycle *break-fusion-bridge* (138)

(a) Une cassure double brins entraîne la perte d'un télomère, (b) la cassure des 2 chromatides sœur forme un chromosome dicentrique, (c) une autre cassure apparaît sur le chromosome porteur d'une répétition inversée, (d) les cycles se répètent en augmentant l'amplification du gène cible (138)

2.3.3.4 Coopération *RUNX1-MLL*

RUNX1 est aussi médiateur de la régulation épigénétique. Bien que *RUNX1* soit dépourvu d'activités enzymatiques à visée épigénétique. Il interagit avec d'autres molécules. Il a été démontré que *RUNX1* pouvait s'associer à une histone acétyl transférase HAT pour induire

un changement de conformation de la chromatine et initier la transcription. Des mutations de *MLL* et *RUNX1* sont observées simultanément chez certains patients atteints de LAM. Il a été démontré que *RUNX1* interagissait physiquement et fonctionnellement avec le gène *MLL* (figure 2-34) (139). Les acides aminés 25 à 106 de la région N-terminale de *RUNX1* se lient directement à la région C-terminale de *MLL* (127).

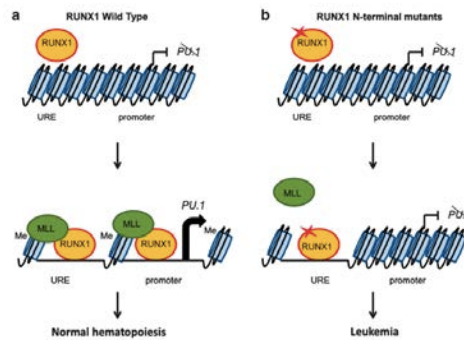


Figure 2-34 Modèle proposé pour le leucémogénèse avec la liaison de *MLL* à la partie N-terminale de *RUNX1* (127)

(A) En premier la protéine *RUNX1* se lie à *PU.1* dans la région URE et recrute le complexe *MLL* pour ouvrir la structure compacte de chromatine. La chromatine partiellement relâchée permet la liaison d'un autre *RUNX1* plus loin de la région promotrice de *PU.1* sur la chromatine compacte. La forme relâchée de la chromatine facilite l'accumulation de co-facteurs et de facteurs de transcription qui initient l'activité transcriptionnelle. (B) Liaison défectueuse de *MLL* à la partie N-terminale de *RUNX1*, relâchement impossible de la chromatine et absence de transcription. Cette dérégulation pourrait mener à la leucémogénèse (127)

L'interaction entre *RUNX1* et *MLL* serait responsable de la tri-méthylation de lysine 4 (K4) de l'histone H3 dans la région URE, région promotrice du gène *PU.1* (140). La liaison de *RUNX1* avec URE régule positivement ou négativement *PU.1*. L'absence de *MLL* ou de *RUNX1* dans des cellules myéloïdes murines montre une baisse du taux de tri-méthylation de H3K4, tandis que la réinstauration d'un des deux gènes permet de retrouver la triméthylation. Ces deux gènes sont donc indispensables dans la médiation de la tri-méthylation de H3K4. De plus, *MLL* protégerait aussi *RUNX1* de la dégradation par le protéasome d'une part, en masquant sur *RUNX1* le site d'accroche du complexe enzymatique et d'autre part, en méthylant les résidus lysine (127). L'étude de CP Koh et al met en évidence que certaines protéines *RUNX1* mutées en N-terminale (L29S et H58N) ne se lient pas à *PU.1*. Cette démonstration suggère l'absence de régulation épigénétique consécutive à une liaison *MLL* déficiente et une incapacité de méthyler H3K4 (127).

3 Cas clinique

Il s'agit de l'observation clinique d'une patiente âgée de 57 ans au diagnostic de son hémopathie aigüe (octobre 2011). Dans ses antécédents personnels on note une ovariectomie bilatérale à l'âge de 30 ans et un carcinome mammaire droit découvert en novembre 2005. Ce dernier a été traité par chirurgie partielle, chimiothérapie et radiothérapie. La patiente a reçu 6 cures de cyclophosphamide associé à du fluoro-uracile et de l'épirubicine (anthracycline). Une hormonothérapie par tamoxifène a été mise en place pendant 2 ans relayée par de l'anastrozole.

3.1.1 Présentation clinique

L'histoire de la maladie commence en septembre 2011 avec une altération de l'état général caractérisée par une asthénie, anorexie et amaigrissement. Ces signes généraux étaient accompagnés d'épisodes fébriles sans point d'appel clinique et d'hématomes.

En novembre 2011, la patiente est hospitalisée. A l'examen clinique on constate un syndrome anémique avec pâleur cutanéomuqueuse et un syndrome hémorragique avec un hématome du membre inférieur gauche sans saignement extériorisé. Il n'y a pas d'hépatosplénomégalie ni d'adénopathie périphérique mais on observe 2 volumineuses masses cervicales bilatérales. Le performans statut est évalué à 1.

3.1.2 Diagnostique biologique

3.1.2.1 *Hémogramme*

La numération formule sanguine initiale réalisée, sur automate Advia, faisait état d'une bicytopenie avec anémie (Hb : 6.2 g/dl) macrocytaire (VGM : 101.8 fl) normochrome (CCMH : 32.8 g/dl) arégénérative (rétyculocytes : 7 Giga/l) et d'une thrombopénie (plaquettes : 54 Giga/l) associée à une hyperleucocytose (leucocytes : 51.010 Giga/l). La numération leucocytaire sur frottis au microscope dénombreait 88% de blastes (soit 44.890 Giga/l), 2% de polynucléaires neutrophiles (soit 1020 Giga/l), 1% de polynucléaires éosinophiles (soit 0.510 Giga/l) et 9% de lymphocytes (soit 4.590 Giga/l).

3.1.2.2 *Frottis médullaire*

Le myélogramme a fait le diagnostic de leucémie aigüe en décrivant une moelle osseuse de cellularité moyenne infiltrée par 86% de blastes indifférenciés (figure 3-1).

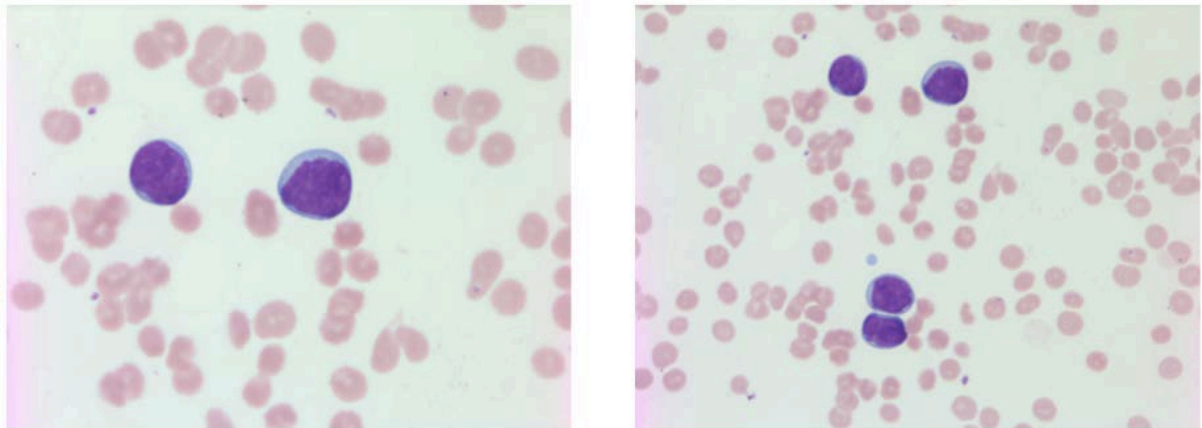


Figure 3-1 Frottis médullaire de la patiente au diagnostic

Moelle de cellularité moyenne, infiltrée par des blastes indifférenciés

3.1.2.3 Immunophénotypage

L'immunophénotypage par cytométrie en flux montrait des cellules blastiques immatures CD34+, HLA-DR + et Tdt intracytoplasmique positif. L'appartenance à la lignée myéloïde était assurée par la présence des CD13 et CD117. La MPO intracytoplasmique était négative, ce qui était compatible avec une LAM indifférenciée de type LAM 0 (selon la classification morphologique de FAB). On notait aussi, l'absence de positivité des marqueurs CD19 et CD56, associés aux LAM avec translocation t(8;21)(q22;q22).

Ainsi, les examens cytologique et immunologique conclurent à une LAM secondaire à la chimiothérapie pour cancer du sein.

3.1.2.4 Génétique

Parallèlement, devant la suspicion diagnostique de LAM le laboratoire de génétique a réalisé une technique directe sur la moelle osseuse et a ensemencé des cultures de 17 heures sous colchicine et de 48H. Le caryotype retrouvait dans toutes les cultures un clone majoritaire porteur d'une translocation t(8;21)(q22;q22) (figure 3-2).

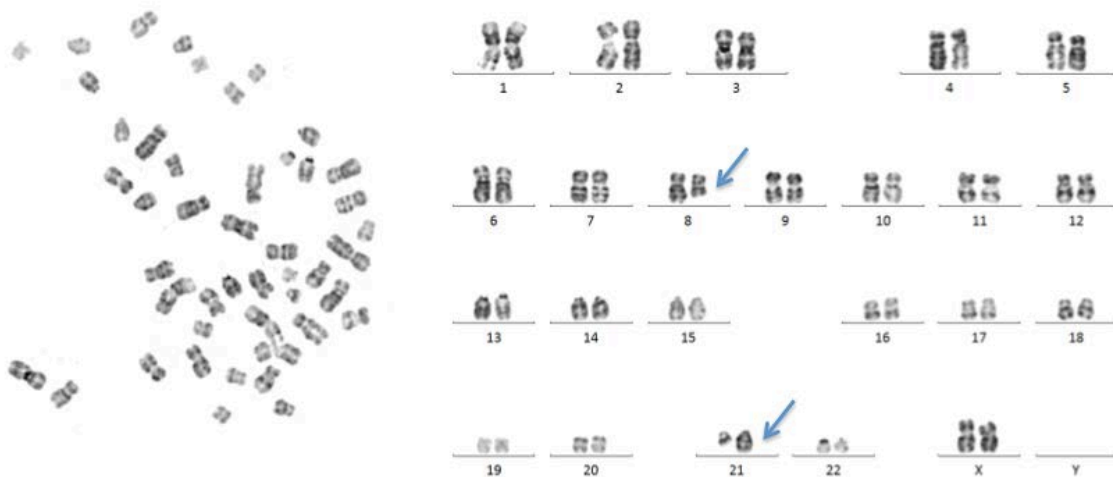


Figure 3-2 Caryotype sur moelle (bandesQ)

46,XX, t(8;21)(q22;q22)[17]/46,XX [1]. BandesQ : coloration à la Quinacrine. Les flèches bleues désignent les chromosomes remaniés : der(8) et der(21)

Cependant, en cytogénétique moléculaire la confirmation de la translocation t(8;21)(q22;q22) avec la sonde double fusion RUNX1-RUNX1T1 (*LSI RUNX1-RUNX1T1 Dual Color Dual Fusion Probes*, Abbott Molecular) mettait en évidence une cassure anormale en amont de *RUNX1T1* sur le bras long du chromosome 8. En effet, les images de FISH métaphasiques montraient une absence de cassure du signal RUNX1T1 et la présence d'une seule fusion sur le chromosome 21 réarrangé portant la cassure du signal RUNX1 (vert) associée au signal entier de RUNX1T1 (rouge) (figure 3-3).

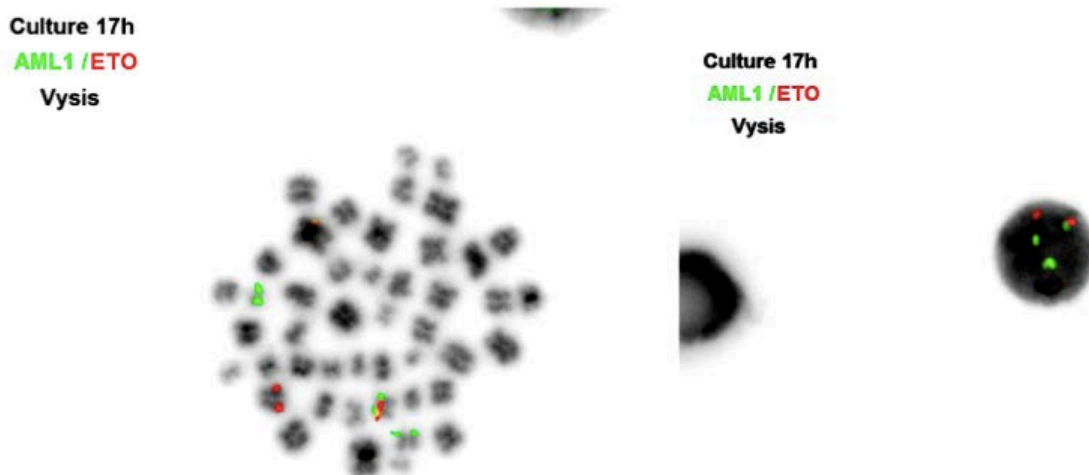


Figure 3-3 Hybridation in situ (FISH) sur chromosomes métaphasiques (gauche) et interphasiques (droite)

Sonde AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) *LSI RUNX1-RUNX1T1 Dual color dual fusion probes*, Abbott Molecular. ish t(8;21)(RUNX1+ ;RUNX1+,RUNX1T1+)[5].nuc ish (RUNX1T1 x 2,RUNX1 x 3)[73/100]. La sonde verte correspond à RUNX1

(AML1) et la sonde rouge à RUNX1T1 (ETO). Cassure anormale en amont de *RUNX1T1* et fusion (sonde rouge et verte) sur le chromosome dérivé du 21 porteur de *RUNX1* remanié

De plus, en biologie moléculaire, le transcrit de fusion RUNX1-RUNX1T1 n'était pas retrouvé en RT-PCR.

Ainsi, il y avait une translocation cytogénétique t(8;21)(q22;q22) atypique impliquant le gène *RUNX1* mais pas le gène *RUNX1T1*. L'association de cette anomalie avec la cytologie de type indifférenciée corroborait le caractère secondaire de la LAM et par conséquent classait cette hémopathie en pronostic défavorable.

3.1.2.5 Reste du bilan biologique

Par ailleurs, l'exploration biologique biochimique révélait un taux de LDH augmenté à 420 UI/L. Il n'y avait pas de CIVD au bilan d'hémostase : le temps de céphaline avec activateur, le temps de Quick et le fibrinogène étaient normaux. Les D dimères étaient élevés à 3399 µg/L mais la recherche de monomères de fibrine était négative.

3.1.3 Prise en charge

Avant la chimiothérapie un traitement cyto-réducteur par hydroxycarbamine a été mis en place. Puis la patiente a été incluse dans le protocole LAM2006 IR bras droit. La chimiothérapie d'induction comprenait :

- cytarabine 200 mg/m² soit 338 mg de J1 à J7
- daunorubicine 60 mg/m² soit 101 mg de J1 à J3

Devant la persistance de 45% de blastes au myélogramme à J15 de traitement, une chimiothérapie de renforcement a été décidée :

- cytarabine 1 g/m² soit 1690 x2 mg/jour de J1 à J3
- daunorubicine 35 mg/m² soit 59.25 mg à J1 et J2

Au cours de l'hospitalisation la patiente développe une cellulite latéro-cervicale gauche avec thrombose veineuse secondaire. Une pneumopathie à pneumocystis est aussi diagnostiquée.

La patiente sort d'aplasie fin novembre 2011 et retourne à domicile avec un suivi prévu en hôpital de jour.

Une mini consolidation est réalisée :

- cytarabine 85 mg x2/jour de J1 à J7
- daunorubicine 101 à J1 et J2

La première consolidation a été effectuée en janvier 2012 sans mitoxantrone mais avec de la cytarabine 1 g/m² x2/jour soit 1750 mg de J1 à J5.

Le mauvais pronostic de cette LAM, l'âge de la patiente, son état général et l'existence de donneurs compatibles permettaient un schéma thérapeutique d'induction suivi d'allogreffe de moelle osseuse. Le typage HLA des 2 sœurs de la patiente s'est révélé incompatible.

3.1.4 Suivi

A la fin de la phase d'induction (janvier 2012) la patiente présentait une rémission cytologique et cytogénétique. La FISH interphasique effectuée sur technique directe à l'aide de la sonde RUNX1-RUNX1T1 trouvait une image normale avec deux signaux RUNX1 et deux signaux RUNX1T1 sans signal de fusion sur 200 noyaux analysés.

La patiente a bénéficié d'une allogreffe en mars 2012 avec un greffon 10/10^{ème} non apparenté. Le myélogramme établi vingt-six jours après greffe indiquait une sortie progressive d'aplasie, l'absence de blaste et la prise de greffe. Le traitement immunosuppresseur par cyclosporine est stoppé en janvier 2013 soit 10 mois post allogreffe. Le suivi du chimérisme présente un chimérisme complet jusqu'en juillet 2013.

3.1.5 Rechute

Malheureusement, un an et demi après allogreffe, l'hémogramme de la patiente présente 18% de blastes et l'analyse médullaire confirme le diagnostic de rechute avec présence de 46% de blastes. L'étude du chimérisme début août montrait la présence de 6.5% d'ADN receveur. L'étude en cytogénétique conventionnelle faite en septembre 2013 attestait la réapparition du clone porteur de la translocation t(8;21)(q22;q22) atypique dans 9 mitoses sur 31 analysées. De même, au niveau cytogénétique moléculaire, les FISH métaphasique et interphasique retrouvaient des images identiques au diagnostic (figure 3-4).

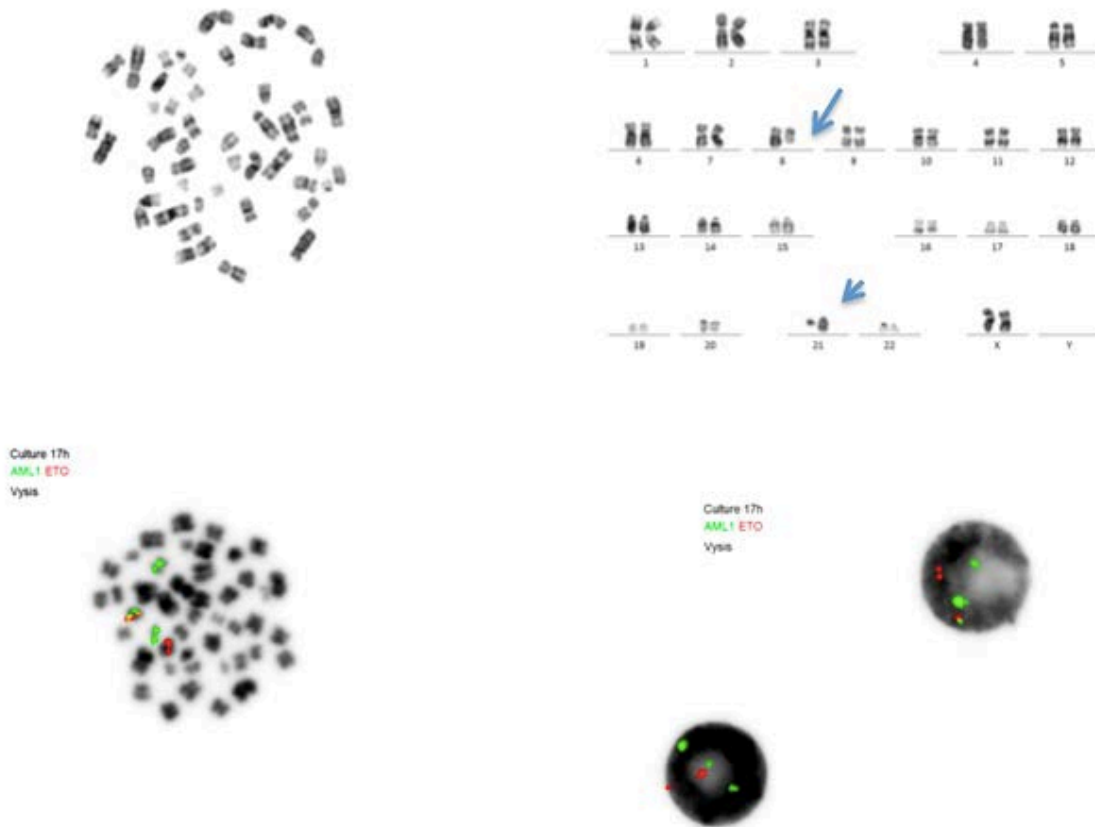


Figure 3-4 Analyse cytogénétique à la rechute de la patiente

Cytogénétique conventionnelle bandesQ (Haut) et cytogénétique moléculaire (Bas LSI RUNX1-RUNX1T1 *Dual color dual fusion probes*, Abbott Molecular). 46,XX,t(8;21)(q22;q22)[9]/46,XX[23].ish t(8;21)(RUNX1+ ;RUNX1+,RUNX1T1+)[5].nuc ish (RUNX1T1 x 2, RUNX1 x 3)[45/100]. Sur le caryotype les flèches désignent les chromosomes remaniés : der(8) et der (21). En FISH : la sonde verte correspond à RUNX1 (AML1) et la sonde rouge à RUNX1T1 (ETO). On retrouve une cassure anormale en amont de RUNX1T1 et fusion (sonde rouge et verte) sur le chromosome dérivé du 21

L'analyse moléculaire a été aussi répétée. Ainsi, le transcrit de fusion RUNX1-RUNX1T1 était absent et il n'y avait pas de duplication en tandem de *FLT3*.

L'attitude thérapeutique a été décidée après réunion pluridisciplinaire en prenant compte des antécédents de traitement par anthracyclines, de l'insuffisance cardiaque et de la gravité de cette leucémie secondaire. Ainsi, la patiente a bénéficié d'une ré-injection de lymphocytes du donneur à dose 1×10^6 CD3/kg sans efficacité.

Dans les deux mois suivant la rechute la patiente est décédée des suites d'une infection sévère consécutive à sa neutropénie.

4 Objectifs

L'histoire clinique et biologique de cette patiente est intéressante. La présentation cytologique indifférenciée de type LAM 0, la mise en évidence d'une translocation t(8;21)(q22;q22) au caryotype associées à un antécédent de chimiothérapie pour néoplasie mammaire multiplient les mécanismes de leucémogénèse de ce cas. L'exploration plus approfondie de la translocation t(8;21)(q22;q22) atypique est nécessaire à la compréhension physiopathologique. Ainsi, l'objectif principal a été d'identifier le gène partenaire potentiel du gène *RUNX1* afin de mettre en évidence un transcrit de fusion résultant de la translocation t(8;21). Pour atteindre ce but nous avons suivi une démarche biologique en utilisant un ensemble d'outils de cytogénétique conventionnelle et moléculaire. Le choix, motivé par une revue de la littérature, a été d'employer, notamment, la *rapid amplification of cDNA ends* (RACE ou amplification rapide des extrémités d'ADNc) qui est une technique utilisée en recherche. L'intention a donc été aussi de mettre en place ce procédé au sein du laboratoire de génétique du CHU de Nancy.

5 Matériels et méthodes

5.1 Chromosomes bactériens artificiels (*Bacterial artificial chromosome* ou BACs)

5.1.1 Objectifs

Le développement des BACs dans les années 1990 est concomitant au projet de séquençage du génome humain. Les BACs permettent la construction de bibliothèques d'ADN et de cartographies chromosomiques utiles pour isoler de courts fragments d'ADN facilitant le séquençage direct (141). Les BACs se composent de vecteurs d'expression qui synthétisent des protéines à partir d'un fragment d'ADN d'intérêt inséré au sein de sa propre séquence d'ADN. Ce vecteur est introduit dans un hôte bactérien et profite de la machinerie cellulaire pour réaliser la transcription puis la traduction du fragment d'intérêt. Les BACs utilisent la bactérie *Escherichia coli* facteur F. Le facteur F est un plasmide (vecteur) qui a la propriété de s'intégrer et de s'exciser du chromosome bactérien. Ce plasmide de forme circulaire porte des gènes capables de réguler sa répllication et de contrôler son nombre de copie. Ainsi, le plasmide F est maintenu au nombre de une à deux copies par cellule ce qui réduit les risques de recombinaisons entre les fragments d'ADN portés par le vecteur et stabilise le système de clonage. Les *Escherichia coli* ne reçoivent qu'un seul plasmide F qui, lui-même, peut porter un insert d'ADN étranger de 75 à 300 kb (142).

Les bactéries mises en culture multiplient le fragment d'ADN d'intérêt. Après extraction du plasmide, il est possible de le coupler à un fluorochrome et de l'utiliser ensuite comme une sonde de FISH.

Le recours aux BACs dans notre recherche était nécessaire pour préciser le point de cassure sur le chromosome 8 remanié afin d'identifier le ou les gène(s) partenaire(s) potentiel(s) proche(s) de la région réarrangée.

5.1.2 Sélection des BACs

Afin de déterminer les BACs opportuns il a fallu tout d'abord délimiter la zone de couverture de la sonde RUNX1-RUNX1T1 sur le chromosome 8. Pour cela la fiche fournisseur Abbott Molecular fut nécessaire (figure 5-1). Cette dernière indiquait le SHGC-140870 en amont du gène *RUNX1T1* comme point d'ancrage centromérique de la sonde spectrum orange pour une taille d'environ 655 kb. Le site de bio-informatique UCSC Genome browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) développé par l'Institut de génomique et le Centre d'ingénierie et de Science biomoléculaire de l'université de Santa Cruz en Californie

rassemble un ensemble d'informations génétiques et notamment les séquences de référence. L'outil de recherche nous a permis de trouver les coordonnées exactes du marqueur STR (*short tandem repetition*) SHGC-140870 : 92758094-92758599. On en a déduit que la sonde spectrum orange se répartissait entre les nucléotides 92758094 et 93413094 (Human GRCh 38). Ainsi, les BACs ont été choisis en amont de la sonde et après la région centromérique.

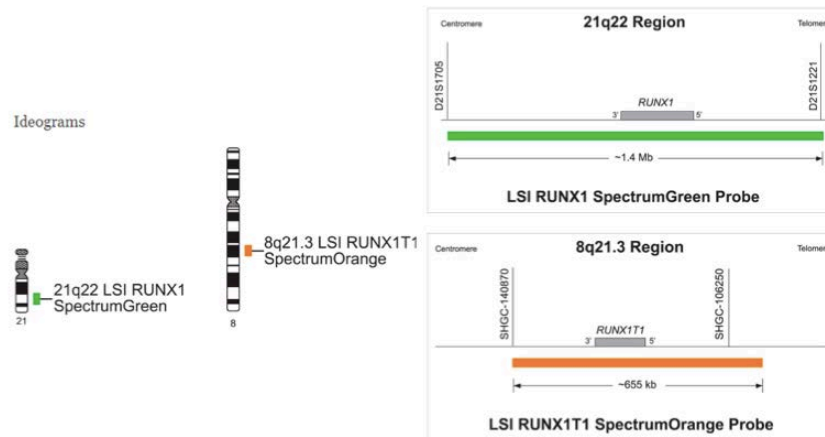


Figure 5-1 Fiche fournisseur LSI RUNX1-RUNX1T1 Dual Color Dual Fusion Probes, Abbott Molecular

Dans un deuxième temps, la librairie BACPAC Ressources Center (*Children's Hospital Oakland Research Institut*, <http://bacpac.chori.org>) nous a donné accès aux caractéristiques des différents BACs existants dans notre zone d'intérêt. Cinq BACs ont été sélectionnés (tableau 5-1), séparés les uns des autres de 2 à 5 Mb pour qu'ils soient le plus informatifs possible.

Tableau 5-1 Chromosomes bactériens artificiels sélectionnés

Chromosomes bactériens artificiels	RP11-692N10	RP11-8H12	RP11-80P18	CTD-2005B12	RP11-701F8
Position (HG17)	78813425-78999920	83316594-83482484	88151299-88318399	90625590-90754753	92732973-92896230
Couleur du marqueur	Rouge	Vert	Rouge	Vert	Rouge

L'activité intensive du secteur de pathologies constitutionnelles du CHU impose régulièrement le besoin de définir précisément les locus impliqués dans les remaniements observés sur les caryotypes. Le laboratoire de génétique possède donc une grande librairie de BACs conservés à -80°C sur des plaques 96 puits.

5.1.3 Préparation/Réalisation

Trois étapes ont été nécessaires pour réaliser une hybridation avec des BACs marqués.

5.1.3.1 La culture bactérienne

Effectuée sur deux jours consécutifs, après réalisation des milieux de cultures liquides et gélosés. A J0, était lancé l'ensemencement (par épuisement) sur une boîte de pétri à l'aide de pipettes Pasteur stériles chargées en BAC. La boîte a été mise à l'étuve à 37°C toute une nuit. A J1 au matin, la pré-culture a été poursuivie dans un tube de 50 ml stérile contenant 5 ml de milieu liquide, 3.125 µl de chloramphénicol à 20 mg/ml et une colonie isolée à partir de la culture sur gélose de la veille. Le tube scellé par du parafilm percé a été mis sous agitation à 300 rpm à 37°C. Après 7h30 d'incubation, dans un erlen associant 50 ml de milieu de culture liquide et 31.25 µl de chloramphénicol à 20 mg/ml a été ajouté 87.5 µl de pré-culture. Parafilmé, l'erlen a été incubé toute une nuit sur agitateur à 300 rpm à 37°C. Enfin, à J2 la culture sur nuit a été transférée dans un nouveau tube de 50 ml puis centrifugée 20 minutes à 4600 rpm à 4°C.

5.1.3.2 L'extraction et purification d'ADN de BAC

Cette phase a été réalisée avec le kit d'extraction NucleoBond PC 100 distribué par Macherey-Nagel. L'extraction a été commencée par un lavage du culot cellulaire avec 10 ml de PBS suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 4600 rpm à 4°C. Ensuite, il a fallu re-suspendre délicatement le culot dans 8 ml de tampon de lyse S1+RNase A avant de le transférer dans des tubes de 50 ml propres. On a ajouté dans ces tubes 8 ml de tampon de lyse S2 et agité par retournement 6 à 7 fois. Puis on a rajouté 8 ml de tampon de lyse S3, agitation et incubation du tube 5 minutes dans la glace. Pendant le temps d'incubation il a fallu préparer une colonne d'extraction et un filtre que l'on a humidifié avec 2.5 ml de tampon N2. Après on a versé le lysat bactérien sur le filtre. Le produit récupéré a été alors versé sur la colonne où l'on a ajouté doucement 12 ml de tampon de lavage N3. Une fois le tampon passé, on a positionné la colonne sur un tube de 15 ml propre et on a élué l'ADN avec 5 ml de tampon 5N préalablement chauffé au bain marie à 50°C. La précipitation se fit par adjonction de 3.5 ml d'isopropanol complété par une centrifugation de 1 heure à 4500 rpm à 4°C. Le culot obtenu a été lavé avec 2 ml d'éthanol à 70%. On a brièvement vortexé puis centrifugé une nouvelle fois 20 minutes à 4500g à température ambiante. Enfin, on a ôté le surnageant et laissé sécher le culot 5 à 10 minutes. Après avoir re-suspendu l'ADN avec 5 µl de TE pendant 1 heure à température ambiante, on a dosé l'ADN au nanodrop.

5.1.3.3 Le marquage direct de BAC

Il est réalisé avec le kit Nick translation et les dUTP SpectrumGreen et/ou SpectrumRed de la société Abbott. La réalisation des mix réactionnels a été faite sur glace. Après dilutions des dNTP, dTTP et dUTP, la préparation des mix a été organisée en fonction du nombre de BAC à marquer en ajoutant une marge de 0.5 µl. Dans chaque tube de marquage il a fallu mettre le volume d'ADN du BAC équivalent à 1µg et ajuster avec le volume d'eau nécessaire pour avoir un volume total final de 50 µl. Après avoir vortexer doucement et placer les mix à 15°C pendant 45 minutes, le marquage a été vérifié par migration sur gel 0.8%. Le marquage était estimé correct lorsque le smear s'étalait entre 200 et 600 pb.

Ayant cinq BACs nous avons attribué trois marquages SpectrumRed et deux SpectrumGreen alternativement.

La précipitation des sondes marquées a consisté d'abord à un ajout de 40 µl d'ADN Cot, de 8.5 µl d'acétate de sodium et de 233.75 µl d'éthanol absolu froid au 45 µl de produit de marquage. Puis le mélange a été vortexé, incubé 10 minutes minimum à -20°C et centrifugé 30 minutes à 14500 rpm à 4°C. Après élimination du surnageant on a complété avec 500 µl d'éthanol à 70% et on re-centrifugé 5 minutes. Le culot a été laissé 10 minutes à sécher puis remis en suspension à l'aide de 10 µl de tampon d'hybridation. La solution obtenue pouvait ensuite être conservée à -20°C.

5.1.4 Test

Une fois les BACs marqués il est indispensable de vérifier leur qualité et leurs positions avec des témoins. Les témoins sont des patients ayant un caryotype sur sang normal sur lesquels on hybride simultanément une sonde locus spécifique connue (témoin interne) et la sonde à tester. A savoir que les deux sondes doivent avoir une fluorescence différente et s'hybrider sur le même chromosome. La zone d'intérêt se trouvant sur le bras long du chromosome 8, on a donc déterminé deux sondes contrôles (une verte et une rouge) spécifique du bras court (8p11) (tableau 5-2).

Tableau 5-2 Chromosomes bactériens artificiels témoins

Chromosomes bactériens artificiels	RP11-589C21	RP11-642I24
Position (HG17)	41992858-42155379	41795492-41975651
Couleur du marqueur	Rouge	Vert

L'application du test sur le matériel cytogénétique de la patiente ne s'est fait qu'après avoir validé les sondes. Comme pour toutes techniques de cytogénétique moléculaire l'hybridation a été réalisée sur les étalements de culots de cultures cellulaires. Pour l'étude de notre cas, l'hybridation métagénétique a été réalisée sur le prélèvement initial (d'octobre 2011). Nous avons réalisé quatre étalements du prélèvement répartis sur deux lames afin de pouvoir hybrider plusieurs combinaisons de BACs (tableau 5-3).

Tableau 5-3 Combinaisons d'hybridation des BACs

	A	B
Lame 1	RP11-692N10 + RP11-8H12	RP11-80P18 + CTD2005B12
Lame 2	RP11-701F8 + RP11-8H12	RP11-692N10 + CTD2005B12

La technique d'hybridation, selon le protocole utilisé par le laboratoire, s'est effectuée sur des lames vieillies naturellement (laissées à l'air libre). Un prétraitement dans un bain de pepsine suivi d'un rinçage au PBS a été fait. Puis, les lames ont été déshydratées par passage dans trois bains d'alcool successifs à 70%, 80% et 100%. Parallèlement, les sondes ont été préparées chacune dans un aliquot en mélangeant : 8 µl de tampon d'hybridation, 1 µl de sonde marquée (BAC) et 1 µl de sonde témoin. Ces mix ont été vortexés puis centrifugés brièvement. Les lames ont été disposées sur une plaque chauffante et on y a appliqué les mix de sondes. On a déposé une lamelle sur chaque lame que l'on a scellée avec du rubber ciment. Par la suite, la co-dénaturation thermique s'est faite sur l'Hybrite (Dako Cytomotion Hybridizer StatSpin, plaque chauffante) programmé à 72°C pendant 3 minutes poursuivie à 37°C toute une nuit.

Le lendemain, on a ôté les lamelles et l'on a plongé les lames dans une première solution de lavage SSC 0.4/ 0.3% Igéal chauffée à 72°C pendant 2 minutes. Le deuxième bain à température ambiante était composé de SSC 2/ 0.1% Igéal et a duré 15 secondes. Une fois les lames égouttées, on a déposé 10 µl de DAPI (contre colorant afin d'identifier les noyaux et mitoses, Abbott Molecular) que l'on a recouvert d'une grande lamelle. Enfin, les lames ont été conservées à 4°C jusqu'à la lecture au microscope à fluorescence (Axioplan 2 imaging, ZEISS).

5.2 Amplification en chaîne par une polymérase (*Polymerase chain reaction, PCR*) et Amplification en chaîne par une transcriptase inverse (*Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT PCR*)

5.2.1 Objectifs

La cellule contient deux types d'acides nucléiques (142,143) :

- l'acide désoxyribonucléique (ADN), composant les 46 chromosomes humain et porteurs du génome.
- l'acide ribonucléique (ARN), issu de la transcription de l'ADN, lien entre le génotype (ADN) et le phénotype (protéine).

Ces deux acides ne possèdent pas les mêmes propriétés physico-chimiques et leur analyse ne fournit pas les mêmes informations. Par exemple, l'étude des transcrits de fusion consécutifs à des translocations chromosomiques se fait sur l'ARN extrait des cellules nucléées. L'épissage post transcription excise les introns (lieu préférentiel des points de cassure) de l'ADN et raboute les exons entre eux, rendant les ARN et les protéines de fusion uniformes. Nous avons donc travaillé et réalisé nos techniques à partir de l'ARN de la patiente extrait au Trizol® au moment du diagnostic sur les prélèvements de moelle osseuse recueillis sur tube EDTA (protocole en annexe 1).

La technique de PCR, décrite par Kary Mullis en 1983, est basée sur l'amplification de fragments d'ADN grâce à une ADN polymérase. La zone d'ADN d'intérêt est encadrée par des « amorces » ou oligonucléotides de séquence nucléique connue complémentaire de la zone à amplifier et indispensables au fonctionnement de l'ADN polymérase. Cette dernière est une enzyme issue d'une bactérie thermophile de geysers : *Thermus aquaticus*, qui lui a donné son nom de Taq polymérase.

L'amplification se déroule en trois étapes :

- La dénaturation : les deux brins d'ADN sont séparés par chauffage à haute température allant jusqu'à 95°C. A cette température, l'ADN polymérase présente dans le milieu de réaction résiste à la dégradation.
- L'hybridation : les deux amorces d'ADN (sens et anti-sens) simple brin s'apparient au fragment d'ADN dénaturé à amplifier lorsque la température de la réaction est abaissée vers 50 à 60°C. Les oligonucléotides sont importants car ils amorcent littéralement le travail de l'ADN polymérase.

- L'élongation : A 72°C la Taq polymérase copie l'ADN simple brin à partir des deux amorces. Le fragment d'ADN d'intérêt se retrouve alors dupliqué.

La réaction de PCR se poursuit en répétant n fois le cycle des trois étapes. En fin de technique on possède théoriquement 2^n copies de la région d'intérêt.

Cette méthode peut aussi s'appliquer à l'ARN. Pour cela, il faut rajouter une étape préalable de façon à obtenir un brin d'ADN complémentaire (ADNc). L'utilisation d'une transcriptase inverse ou d'une ADN polymérase ARN dépendante permet de copier à l'aide d'une amorce (ou mélange d'hexamères) et de désoxyribonucléotides, une molécule d'ARN simple brin en une molécule d'ADN simple brin complémentaire à l'ARN messenger. A noter, qu'un inhibiteur de RNase est ajouté à la préparation. A partir de ce brin d'ADNc la réaction de PCR classique peut s'effectuer.

5.2.2 Le choix des amorces

Le choix des amorces de PCR doit être méticuleux car il influence sur la réussite et la spécificité de la réaction. Les amorces doivent être spécifiques, stables et compatibles (142).

- Spécificité : modulée par plusieurs critères, idéalement, la taille doit être de 20 à 30 nucléotides, le contenu en CG entre 40 et 60% et la température de fusion (T_m) comprise entre 45 et 70°C.

- Stabilité : la stabilité de l'extrémité 3' conditionne une bonne initiation de la polymérisation. Il faut donc quelques bases GC à proximité de la 3'.

- Compatibilité : la différence entre les T_m des amorces doit être inférieure à 4°C.

L'élaboration des amorces se fait en deux étapes avec une étape de construction (recherche bioinformatique de séquence encadrant la région d'intérêt et une deuxième phase où l'on vérifie la spécificité de la séquence à la zone d'intérêt en effectuant un alignement local informatique (BLAST). De nombreux outils informatiques accessibles par internet sont capables de proposer en quelques secondes plusieurs combinaisons d'amorces en fonctions de la séquence proposée et de conditions prédéfinies. Ainsi, pour dessiner les sondes nécessaires pour nos techniques de PCR quantitative et de RACE PCR nous avons utilisé Primer-Blast disponible sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

En se basant sur la séquence de l'ARN de transfert NM001754.4 transcrit variant 1 de RUNX1 nous avons choisi quatre couples d'amorces (sens (F) et anti-sens (R)) pour la RQ-PCR et deux amorces pour la RACE PCR (tableau 5-4).

Tableau 5-4 Amorces sélectionnées

Dénomination de l'amorce	Séquence nucléotidique (NM001754.4)	Nombre de bases
RUNX1 Ex1a-1b F	AGCCTGGCAGTGTGAGAAGT	20
RUNX1 Ex1a-1b R	GGGACTCAATGATTTCTTTTACCA	24
RUNX1 Ex1b-2 F	CCTTCAGAAGAGGGTGCATT	20
RUNX1 Ex1b-2 R	TGGACGTCTCTAGAAGGATTCAT	23
RUNX1 Ex4-5 F	TCGGCTGAGCTGAGAAATG	19
RUNX1 Ex4-5 R	GTGATGGTCAGAGTGAAGCTTTT	23
Runx1 Ex5-6 F	CTTCACAAACCCACCGCAAG	20
Runx1 Ex5-6	TCGGAAAAGGACAAGCTCCC	20
3'RACE Ex4	GGATGTTCCAGATGGCACTCTGG	23
3'RACE Ex4 nichée	GAGCTGAGAAATGCTACCGCAG	22

La société Eurogentec a fabriqué les amorces. A leur réception les amorces ont été diluées et aliquotées afin d'obtenir une concentration de 10 µM.

5.2.3 Réalisation test patiente

Avant de réaliser la RQ-PCR, les amorces de RUNX1 ont été testées avec une PCR classique afin de déterminer la température de fusion optimale. Le risque d'hybridation non spécifique est diminué lorsque le T_m des amorces est élevé. La température d'hybridation est calculée à partir du T_m des amorces ($T^{\text{hybridation}} = T_m - 5^\circ\text{C}$). Les tests ont été effectués à 62, 63, 64 et 65°C sur les échantillons de la patiente, d'un témoin ETV6-RUNX1 positif, d'un témoin RUNX1-RUNX1T1 positif et d'un témoin normal. Nous disposons d'ADNc pour les témoins, en revanche pour la patiente il a fallu pratiquer une RT-PCR à partir de l'ARN extrait du prélèvement au diagnostic (cf protocole extraction d'ARN au trizol en annexe 1)

La réaction de reverse transcription a nécessité une quantité d'ARN de 1 µg ajusté au volume de 9.5 µl avec de l'eau qualité biologie moléculaire (EUROBIO, réf : GAUEAU OOF-01) associée à 1 µl de mélange d'hexamères (Random Primers 3mg/ml, INVITROGEN, réf : 48190-011). Puis, cette dilution en tube (DNA/RNAses free stérilisés Dutscher) a été placée dans un thermocycleur (Applied Biosystems 2720) à 70°C pendant 10 minutes pour linéariser l'ARN. Un refroidissement rapide a été opéré par transfert immédiat des aliquots dans un bac de glace. Le mix réactionnel (Kit reverse transcriptase, INVITROGEN, réf : 18064-014) a été préparé avec 4 µl de first strand Buffer 5X, 2µl de DTT (dithioerythrol, antioxydant, stabilise les enzymes à groupement SH), 2µl de dNTP à 10 mM (désoxyribonucléotides, ROCHE, réf : 1196906400), 1µl de SuperScript II RT à 200 u/µl et de 1µl d'inhibiteur de RNase (ROCHE, réf : 3335399) à 40 u/µl. L'hybridation s'est faite à 25°C pendant 2 minutes

suivie d'une élongation de 50 minutes à 42°C. L'inactivation de la réaction s'est effectuée à 70°C durant 15 minutes.

L'ADN mono brin complémentaire obtenu a été par la suite amplifié par PCR en employant le Kit Go Taq Hot start polymérase (PROMEGA M5005) contenant la Go Taq polymérase à 5u/µl, le tampon GoTaq 5X et le MgCl² 25 mM. Chaque mix contenait 5 µl de tampon Proméga, 2 µl de MgCl², 2 µl de dNTP, 1 µl de chaque amorce, 0.1 µl de Go Taq Proméga, 8 µl d'eau et 5 µl d'ADNc. Le cycle PCR dans le thermocycleur Biometra T3000 a été programmé de la manière suivante : 7 minutes à 95°C puis 30 secondes à 94°C, 1 minute à 62°C (ou 63 ; 64 ; 65°C), 1 minute à 72°C pour 35 cycles suivi d'une phase de refroidissement à 10°C.

Une électrophorèse sur gel d'agarose 2% a permis de vérifier à chaque réaction la quantité et la spécificité du produit final de PCR. Cette opération permet de séparer les acides nucléiques chargés négativement en fonction de leur taille au travers d'un gel soumis à un champ électrique. Pour un gel de 200 ml à 2%, 4g de poudre d'agarose (Agarose standard EURO BIO, réf : GE PAGA07-64) on été mélangé avec dans un erlenmeyer avec 200 ml de tris-acétate EDTA (TAE 10X, tampon d'électrophorèse EUROMEDEX, réf : 6U0202-A) et 10 µl d'agent intercalant fluorescent permettant de repérer au trans-illuminateur les différents fragments d'ADN ayant migré (GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain BIOTIUM, réf : 41003). Après avoir chauffé l'erlenmeyer au micro ondes et laissé refroidir quelques minutes, la solution est coulée dans une cuve à électrophorèse où le gel a pris. Ensuite, un mélange de 5 µl de produit de PCR et de 1 µl bleu de bromophénol (colorant permettant de suivre la migration) est déposé dans chaque puit du gel et 5 µl de marqueur de taille (100pb DNA Ladder) dans les puits extérieurs. La migration s'est faite pendant 30 à 60 minutes sous une tension électrique de 110-130 volts. La visualisation finale des migrations s'est effectuée avec le Bio-rad Molecular Imager Gel Doc XR System qui expose les gels à un rayonnement UV de 312 nm

5.3 PCR quantitative en temps réel (Q-PCR)

5.3.1 Objectifs

La PCR quantitative en temps réel mesure la cinétique de formation des amplicons pendant la réaction d'amplification ce qui permet d'en déduire une quantification de la cible dans l'échantillon analysé. La cinétique d'une réaction de PCR se compose de deux phases : une exponentielle pendant laquelle le nombre de copies d'ADN cible est doublé à chaque cycle suivie d'une phase de plateau traduisant la saturation de la réaction. Les produits de PCR sont détectés grâce à un marqueur fluorescent dont l'intensité augmente avec

l'amplification. Le système de détection le plus simple est basé sur l'action d'un agent intercalant comme le SYBR® Green : il émet une fluorescence quand il se fixe à l'ADN double brin et qu'il est excité par des rayonnements ultraviolets. Ce système très sensible a cependant une spécificité dépendante du choix des amorces puisque le SYBR® Green se lie à toutes les molécules d'ADN doubles brins présentes dans la réaction (y compris les dimères d'amorces). La mesure du signal par un module de détection externe à un moment donné au cours de chaque cycle permet le suivi de la réaction de PCR. Ainsi, une courbe d'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycle peut être tracée (figure 5-2). La phase d'initiation associée à une fluorescence faible correspond au bruit de fond. Le point de départ de la partie exponentielle détermine le seuil de détection Ct (*threshold cycle*) (142,144).

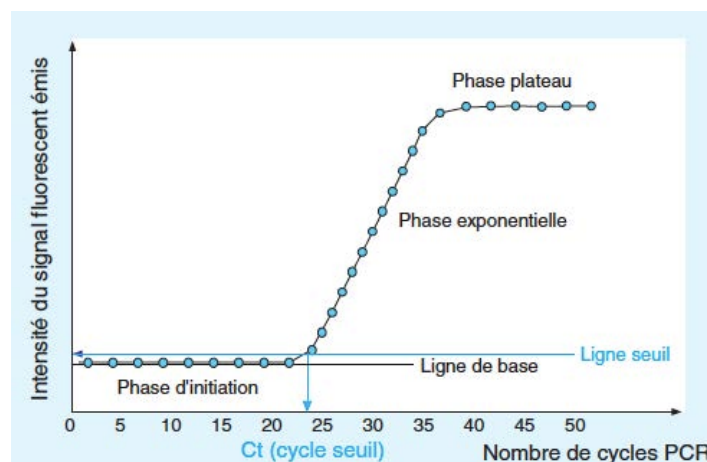


Figure 5-2 Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (144)

La cinétique de la réaction PCR met en jeu en trois phases : une phase d'initiation, une phase exponentielle et une phase plateau. Elle est construite à partir de plusieurs points d'amplification. Un point d'amplification est un point présentant pour coordonnées le nombre de cycles PCR versus l'intensité de fluorescence émise. La ligne de base reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence. La ligne seuil correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. Le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil définit le cycle seuil Ct qui est le point de départ de la phase exponentielle et qui se trouve directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon (144)

Il existe diverses stratégies de quantification (je ne détaille ici que celle que nous avons utilisée). La quantification relative mesure la quantité de cible relativement par rapport à un gène de référence endogène répondant aux mêmes critères d'amplification que la cible. Un rapport cible/référence est établi pour chaque échantillon, le résultat est alors rapporté à un calibrant. Le calibrant est une base d'acide nucléique normale (par exemple un patient sain) qui contient le gène cible et le gène de référence. Au final, le résultat de la quantification sera exprimée par un indice. La méthode comparative des Ct calcule à partir d'une formule mathématique le nombre de molécules du gène cible contenues dans un échantillon :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ calibrant} \quad \text{où } \Delta Ct = Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ gène endogène}$$

5.3.2 Plaque d'efficacité

L'efficacité et la spécificité des amorces doivent être testées avant de réaliser la PCR quantitative. Pour cela, il a fallu effectuer une plaque d'efficacité où les amorces ont été appliquées sur deux témoins RUNX1-RUNX1T1 positif et ETV6-RUNX1 positif. Cette étape obligatoire avec le SYBR® Green permet d'établir une droite d'efficacité et les courbes de dissociation de chaque couple d'amorces. Le but de cette opération est de vérifier la spécificité de l'amplification et l'absence de formation de dimères d'amorces. Les pentes des droites de dissociation obtenues à partir des Ct de chaque dilutions sériées des échantillons d'ADNc matrice devaient être d'environ 3.3 pour une efficacité proche de 100%.

Nous avons travaillé avec le power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, LifeTechnologie) qui contient l'Ampli Taq Gold ADN polymérase, les dTTP/dUTTP et le ROX® (« teinture » qui uniformise la fluorescence). Nous avons travaillé en duplicats. Les mix ont d'abord été préparés et répartis par couple d'amorce afin que chaque puit réactionnel contienne 10 µl de Master Mix, 0.4 µl de chaque amorce et 4.2 µl d'eau. Ensuite 5 µl d'ADNc ont été distribués. Le thermocycleur ABI Prism™ 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem) était programmé avec une pré-phase de 2 minutes à 50°C suivie d'une dénaturation de 10 minutes à 95°C. Les 40 cycles suivants enchaînaient une dénaturation de 15 secondes à 95°C et une hybridation, élongation d'une minute à 60°C.

5.3.3 Plaque test patiente

La Q-PCR a été lancée selon les mêmes modalités techniques que la plaque test d'efficacité. Nous avons rajouté un couple d'amorce pour le transcrit du gène *Abl* (Abelson) choisi pour être le contrôle endogène. *Abl* présente une expression stable dans les leucocytes et l'expression de ce gène est utilisée couramment en hématologie (145). Nous avons donc testé les ADNc de la patiente, d'un témoin RUNX1-RUNX1T1 positif, un témoin ETV6-RUNX1 positif et un pool de témoins normal. Ce dernier était notre ADNc matrice servant de calibrant pour la quantification. A noter que les mix ont été préparés pour quinze puits par amorce de façon à palier aux éventuels erreurs métrologiques.

5.4 Amplification rapide des extrémités d'ADNc (*rapid amplification of cDNA ends, RACE PCR*)

5.4.1 Objectifs

Cette technique est utile pour déterminer les extrémités 5' ou 3' d'un ADN complémentaire. La RACE permet d'amplifier un fragment ADNc issu d'un ARN messager entre une localisation de séquence connue et l'extrémité inconnue 5' ou 3'. Le principe de la 3' RACE tire profit de la queue poly(A) présente naturellement dans tous les ARN messagers. Cette séquence simple commune à tous les ARN messagers peut être un point d'accroche pour une amorce de PCR. La 3' RACE se déroule en plusieurs étapes dont la première consiste à transformer l'ARNm en ADNc avec une reverse transcriptase en utilisant une amorce universelle oligo(dT) auquel est accolé un adaptateur de séquence connue. La seconde étape amplifie l'ADNc nouvellement formé en utilisant une technique de PCR classique. Les amorces encadrant le fragment d'ADNc d'intérêt sont d'une part, à l'extrémité 3', complémentaire du gène connu (ici l'exon 4 de *RUNX1*) et d'autre part, à l'extrémité 5', complémentaire de l'adaptateur de l'amorce universelle (figure 5-3).

Une PCR semi-nichée peut être rajoutée afin d'augmenter la spécificité de la technique. La PCR semi-nichée répond aux principes de la PCR classique. Les produits de PCR obtenus lors d'une première réaction sont amplifiés de nouveau en utilisant une nouvelle amorce en 3' complémentaire du gène connu (*RUNX1*) et plus proche du point de cassure tandis que l'amorce en 5' est conservée. Ainsi, la région d'intérêt amplifiée contenant le partenaire inconnu peut être séquencée et le gène inconnu identifié.

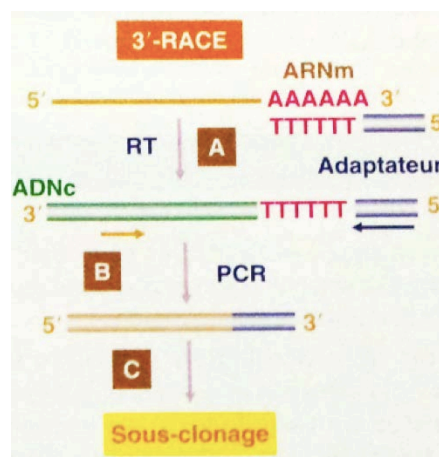


Figure -5-3 Principe de l'amplification rapide de l'extrémité 3' des ADNc (*rapid amplification of cDNA ends, RACE*) (142)

- (A) RT-PCR effectuée sur l'ARNm en présence d'une amorce oligo(dT)-adaptateur. (B) PCR réalisée à partir de l'ADNc en utilisant une amorce complémentaire de l'adaptateur et une amorce interne complémentaire de l'ADNc. (C) Le produit de PCR est prêt pour le sous clonage et détermination de l'extrémité 3' par séquençage ou pour une PCR semi-nichée. D'après (142)

5.4.2 Réalisation

La 3'RACE a été réalisée avec les amorces du 5'/3' RACE Kit 2nd Generation de ROCHE et les deux amorces spécifiques de l'exon 4 du gène *RUNX1* dessinées préalablement. Nous avons aussi employé le Kit GoTaq Hot Start Polymérase (Promega M2005). Pour cette technique nous avons pris l'ARN extrait au diagnostic de la patiente et l'ARN extrait d'un témoin RUNX1-RUNX1T1 positif.

5.4.2.1 RT-PCR

La RT-PCR, première étape de la RACE PCR a suivi le protocole habituel du laboratoire (décrit précédemment) en utilisant l'amorce oligo dT-anchor primer du kit ROCHE.

5.4.2.2 PCR du gène *Abelson* de contrôle

Une PCR du transcrit du gène *Abl* a été réalisée sur le produit de la RT-PCR (5µl d'ADNc neo formé) de façon à vérifier la fonctionnalité de l'amorce du kit de RACE, l'absence d'inhibiteur d'amplification et la synthèse d'ADN complémentaire. La préparation des mix avec le Kit Go taq Hot start Polymérase respectait le protocole de PCR classique avec l'utilisation d'amorces spécifiques du gène *Abelson*. Ces amorces étaient celles employées en routine par le laboratoire. Les 35 cycles d'amplification dans le thermocycleur Biometra T3000 étaient programmés pour une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes puis une hybridation à 62°C pendant une minute et une élongation d'une minute à 72°C.

Une migration des produits de PCR sur gel d'agarose à 2% a été réalisée pour visualiser l'amplification du gène *Abl*.

5.4.2.3 3'RACE amplification

La deuxième étape de la 3' RACE PCR consistait à amplifier l'ADNc contenant l'amorce avec adaptateur universel. Pour cela nous avons utilisé notre amorce Exon 4 RACE PCR spécifique du gène *RUNX1* ainsi que l'amorce PCR anchor primer présente dans le kit de RACE et complémentaire de l'adaptateur. Le mix réactionnel de chaque échantillon se composait de 5 µl de tampon Promega, 2 µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP, 1 µl de chaque amorce, 0.1 µl de Go Taq Promega, 8 µl d'eau et 5 µl d'ADNc. Suite à la pré phase de dénaturation de 7 min à 95°C, les 40 cycles d'amplification suivaient un schéma de dénaturation à 94°C en 30 secondes, une hybridation pendant 30 secondes, une élongation de 4 minutes à 72°C maintenue durant la phase d'élongation finale de 7 minutes. Ne connaissant pas la

température d'hybridation de la PCR anchor primer, nous avons effectué un gradient de température sur le thermocycleur Veriti (HTDS International) de 63, 65 et 67 °C.

En fin de réaction, 5 µl de produits de PCR de chaque échantillon ont été déposés sur un gel d'agarose à 2%.

5.4.2.4 3'RACE nichée

Pour augmenter la spécificité de la réaction de RACE PCR, les meilleurs amplicons de l'étape précédente ont été ré-amplifiés à l'aide d'une PCR semi-nichée. Les mix de PCR associaient cette fois 5 µl de tampon Promega, 2 µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP, 1 µl d'amorce Exon 4 3'RACE nichée, 1 µl d'anchor primer PCR, 0.2 µl de GoTaq Promega, 13 µl d'eau et 1 µl d'ADN pré amplifié. L'amplification débutait par 10 minutes à 94°C puis les 35 cycles de PCR dans le thermocycleur Biometra T3000 ont répétés 30 secondes de dénaturation à 94°C, l'hybridation 30 secondes à 65°C, l'élongation pendant une minute à 72°C et terminés par 7 minutes d'élongation finale à 72°C. Là encore, 5 µl de chaque échantillon ont migré sur gel d'agarose 2% afin de pouvoir visualiser les produits ré-amplifiés.

5.5 Séquençage

5.5.1 Objectifs

Le séquençage est une technique qui a pour but de déterminer l'enchaînement des nucléotides sur l'ADN. L'une des principales méthodes mise au point initialement fut celle de F.Sanger en 1981. Depuis plusieurs variantes se sont développées mais les principes généraux de cette technique restent conservés.

Pour le *cycle sequencing* ou PCR asymétrique le matériel de départ est un produit de PCR purifié. Une amorce de séquence (souvent celle utilisée lors de la PCR préalable) est aussi indispensable. La réaction de PCR se fait dans un tube dans lequel on mélange l'ADN à séquencer, l'amorce de séquence, une Taq polymérase, des dNTP (déoxynucléotides) et des ddNTP (di-déoxynucléotides). Les ddNTP sont des nucléotides marqués par des fluorochromes (une « couleur » pour chaque base) qui une fois intégrés à la séquence nucléotidique bloque l'élongation car la fonction 3' de l'hydroxyl est remplacée par un hydrogène. L'absence du radical hydroxyl ne permet plus de générer la liaison internucléotidique par le squelette phosphate des acides nucléiques. En fin de réaction, on retrouve donc dans le tube plusieurs produits de tailles différentes se terminant par un fluorochrome. Dans le cas d'une électrophorèse capillaire ces produits vont être déposés sur un gel de polyacrylamide ultrafin et soumis à des champs électriques intenses. La migration

se fait en deux heures et trente minutes pour des séquences d'environ 500 pb. Les produits vont migrer en fonction de leur taille (les produits les plus courts allant le plus loin) et le séquenceur couplé à une camera et un ordinateur vont pouvoir détecter et lire l'émission de fluorescence de chaque fluorofore et établir ainsi la séquence de l'ADN (142).

5.5.2 Réalisation

Nous avons utilisé la technique de séquençage Sanger avec électrophorèse capillaire sur ABI 3130 XL (Applied Biosystem®). La première étape de purification est réalisée avec l'ExoSAP-It® (USB Affymetrix). La PCR de séquence a utilisée le kit Big Dye® Terminator v1.1 Sequencing BufferX5 (Applied Biosystem®) contenant l'AmpliTaq polymérase. Les amorces de séquence ont été celles employées pour la 3' RACE PCR semi-nichée : Exon 4 3'RACE nichée (sens) et PCR anchor primer (anti-sens). Une purification des produits séquençage a été réalisée l'aide du kit Big Dye XTerminator® (Applied Biosystem®)

Afin de confirmer la séquence obtenue, il était nécessaire de séquencer l'ADN sur le brin sens et anti-sens.

5.5.2.1 Séquençage des produits de 3'RACE PCR

Dans un premier temps, le séquençage a été réalisé sur les produits de PCR de la 3'RACE et de la 3'RACE semi-nichée, sur les échantillons correspondant à la patiente (63°C et 65°C) et au témoin RUNX1-RUNX1T1 positif (63°C).

La purification par l'ExoSAP-IT® 1 µl nécessitait l'ajout de 5 µl de produit de PCR. Le thermocycleur Biometra T3000 était programmé pour 15 minutes à 37°C de dégradation des nucléotides et amorces puis 15 minutes à 80°C d'inactivation du réactif.

Pour la PCR de séquence nous avons utilisé 1 µl de Big Dye® Terminator v1.1, 0.5 µl de Buffer sequencing 5X (tampon de séquençage), 1 µl d'amorce (sens ou anti-sens) à 5 µM et 2.5 µl de produit de PCR purifiés. La pré dénaturation, dans le Biometra T3000, d'une minute à 96°C était suivie de 25 cycles enchainant une dénaturation de 10 secondes à 96°C, une hybridation à 50°C et une élongation de 1.15 minute à 60°C.

La purification a été accomplie avec 10 µl de XTerminator® Solution, 45 µl de SAM™ Solution (contenu dans le kit Big Dye XTerminator®), 6 µl d'eau et 3 µl de produit de séquence. Le mix a été ensuite vortexé 30 minutes à la vitesse de 1800 sur le Digital Vortex-Genie 2 puis centrifugé 2 minutes à 1000g.

Après l'électrophorèse capillaire, l'analyse des électrophorégrammes a été faite grâce au logiciel Sequencing Analysis (Applied Biosystem®).

5.5.2.2 Séquençage des produits de 3'RACE PCR semi-nichée sur gel

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une nouvelle électrophorèse des produits de 3'RACE PCR semi-nichée (Patiente 63°C et 65°C, Témoin RUNX1-RUNX1T1 63°C) sur un gel plus résolutif afin de pouvoir séquencer directement les produits de migration.

L'agarose Gel Strength >1000g/cm² (BP160100 Fisher) a permis de préparer un gel à 2% avec 3g d'agarose pour 150 ml de TAE et 7.5 µl de GelRed®. Après une migration de 2 heures, les produits de migration ont été découpés du gel au scalpel stérile, pesés puis transférés chacun dans un tube stérile.

L'extraction de l'ADN du gel d'agarose a été effectuée à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHERY-NAGEL). Pour 100 mg de gel la dissolution nécessitait 200 µl de buffer NTI. Les tubes étaient ensuite incubés 5 à 10 minutes à 50°C, puis vortexés brièvement pendant 2 à 3 minutes. Par la suite, 700 µl d'échantillon passaient sur une colonne (NucléoSpin® Gel and PCR clean-up Column) placée sur un tube de 2 ml. Après 30 secondes de centrifugation à 11 000g le transsudat était jeté et la centrifugation répétée. La membrane de silice a été nettoyée à deux reprises par l'addition de 700 µl de buffer NT3 suivie d'une centrifugation de 11 000g 30 secondes et complétée par une autre d'une minute. Enfin, l'ADN a été élué dans un microtube de 1.5 ml avec le passage de 15-30 µl de buffer NE dans la colonne, une incubation de 5 minutes à température ambiante et une centrifugation d'une minute à 11 000g.

Dans la suite, la réaction de séquençage a été identique au protocole décrit précédemment.

5.6 Identification du transcrit

L'identification du transcrit découvert s'est faite à l'aide de la base de données de génomes d'eucaryotes Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) qui possède un outil informatique BLAST/BLAT permettant de comparer une séquence donnée avec l'ensemble du génome humain. Cet outil établit le pourcentage de similarité entre les séquences et permet d'assimiler la séquence inconnue à une séquence nucléotidique connue. Cela permet donc d'identifier un chromosome, un gène, un exon ou tout simplement une région du génome.

6 Résultats

6.1 Chromosomes bactériens artificiels (BACs)

6.1.1 Série témoins

L'hybridation des BACs sur des témoins « sains » nous permet de valider les cinq sondes (figure 6-1). Tous les BACs s'hybrident sur le même chromosome que leur sonde contrôle, donc tous sont spécifiques du chromosome 8 et de son bras long. Seul le BAC CTD-2005B12 normalement situé en 8q21 entre les nucléotides 90625590 et 90754753 est retrouvé en région télomérique du bras long du chromosome 8.

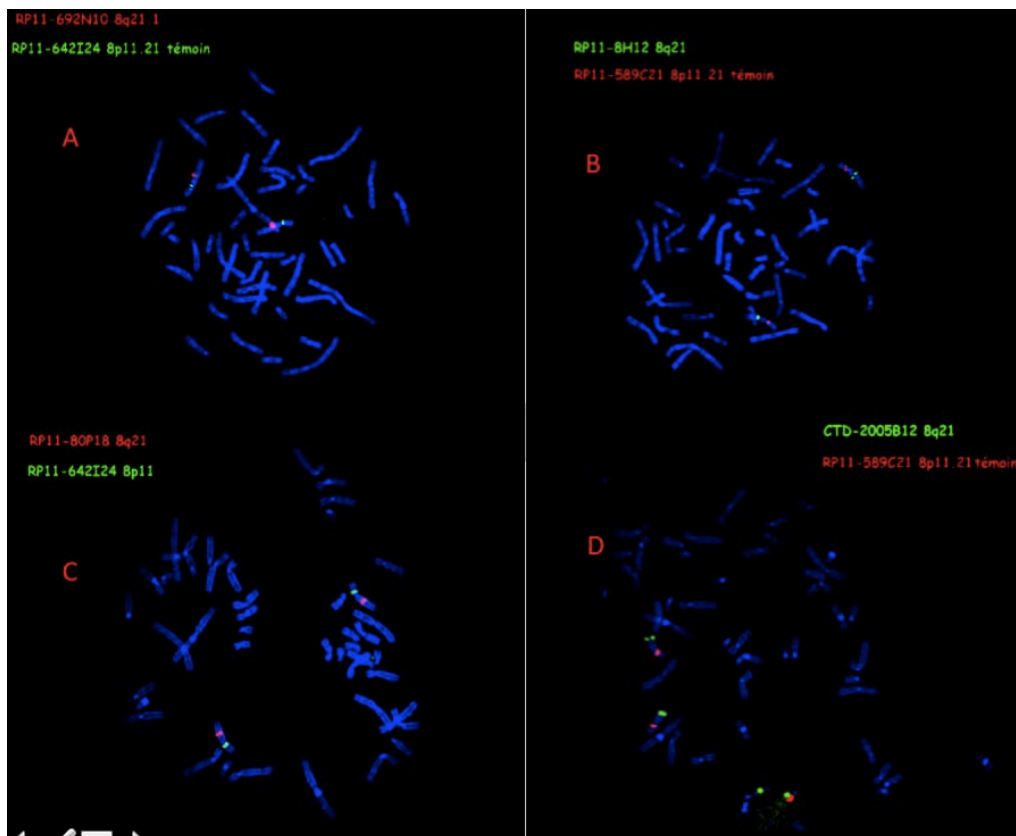


Figure 6-1 Hybridation des chromosomes bactériens artificiels (BAC) sélectionnés sur témoins sains et avec des BACs de position connue comme contrôle interne

(A, B, C, D) Les BACs de contrôle et les BACs sélectionnés s'hybrident sur le même chromosome, identifié comme étant le 8. (D) On remarque que le CTD-2005B12 (sonde verte) est au niveau télomérique du chromosome 8 il est donc mal positionné malgré sa situation en 8q

6.1.2 1^{ère} série

Les résultats de l'hybridation métaphasique sur la patiente sont les suivants (figure 6-2) :

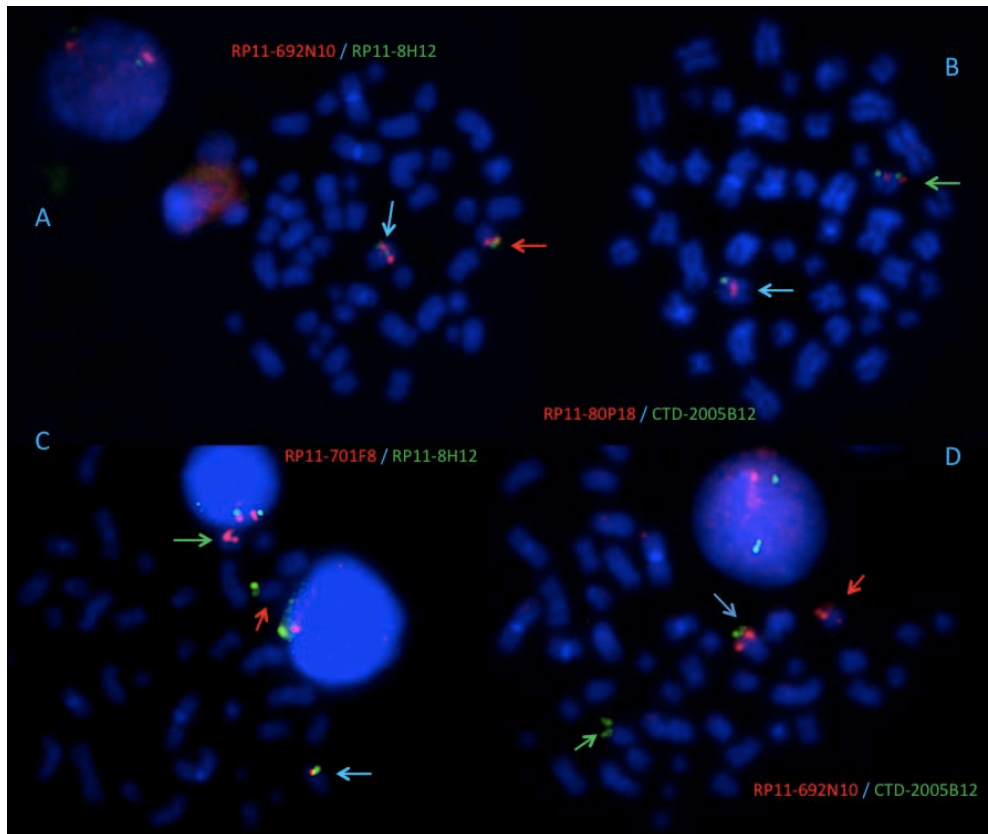


Figure 6-2 Hybridation in situ en fluorescence avec les chromosomes bactériens artificiels sélectionnés

Les flèches bleues désignent les chromosomes 8 normaux, les flèches rouges les chromosomes 8 remaniés der(8) et les flèches vertes les der(21). (A) La métaphase montre un chromosome 8 normal, un der(8) avec les 2 BACs vert-rouge et un der(21) dépourvu de sonde. (B) Sur cette mitose, on observe un chromosome 8 normal, un der(21) porteur des 2 BACs vert-rouge transloqués et un der(8) sans hybridation spécifique. (C) Ici, on retrouve le chromosome 8 normal porteur de 2 BACs, un der(8) avec le BAC vert et un der(21) qui récupère le BAC rouge. (D) Le chromosome 8 normal garde ses BACs tandis que le der(8) conserve le BAC rouge et le der(21) gagne le BAC vert. A noter que (A, B, C et D) possèdent un chromosome 21 normal.

Le point de cassure est situé entre les BACs RP11-8H12 et RP11-80P18, soit entre les nucléotides 83482484 et 88151299 dans la région 8(q21.13q21.3).

6.2 PCR RUNX1

Nous avons réalisé quatre PCR en faisant varier à chaque fois la température d'hybridation. Les premières PCR n'ont pas testé les amorces sur l'ADNc de la patiente afin de ne pas épuiser le matériel génétique dont nous disposons du cas. Les techniques ont été validées

par l'absence de produits de PCR dans les puits négatifs et l'amplification du gène de contrôle interne Abelson.

- La première réaction (figure 6-3) a été effectuée avec une température d'hybridation de 62°C, sur 2 patients RUNX1-RUNX1T1 positifs distincts (n°1 et n°2) et un patient sain.

Le témoin normal présentait une bande aux alentours des 150 pb avec les trois couples d'amorces : 1a-1b, 1b-2 et 4-5.

Un produit de PCR d'environ 150 pb a été aussi retrouvé chez le témoin n°2 RUNX1-RUNX1T1 positif avec les amorces 1b-2 et 4-5. Sur les amorces 5-6 se distinguait une bande de 400 pb pour le patient normal et le témoin RUNX1-RUNX1T1. Cependant, les couples d'amorces des exons 4-5 et 5-6 présentaient des *smears* (trainées de migration) ce qui traduisaient un manque de spécificité.

Le témoin n°1 n'a pas montré de produits d'amplification.

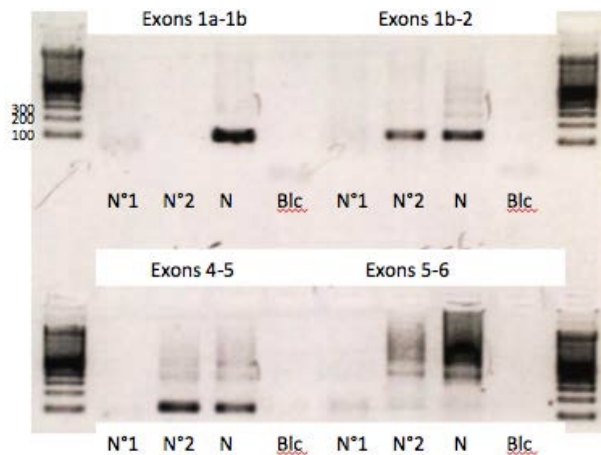


Figure 6-3 Migration des produits de RT-PCR sur gel d'agarose 2%, température d'hybridation 62°C

N°1 et N°2: témoins RUNX1-RUNX1T1 positifs, N : témoin normal, Blc : blanc, contrôle de la réaction de PCR

- L'augmentation de température d'hybridation à 63°C lors de la deuxième PCR montrait une amélioration avec la disparition du *smear* sur les amorces des exons 4-5. Un témoin RUNX1-RUNX1T1 et un témoin négatif normal ont été testés. Chez le témoin sain seules les amorces des exons 5-6 ne distinguaient pas de bande au-dessus de 100 pb. De même, le patient positif RUNX1-RUNX1T1 a montré des produits de PCR au-dessus de 100 pb avec toutes les amorces excepté avec les amorces des exons 1b-2 où aucun amplicon n'apparaissait (figure 6-4).

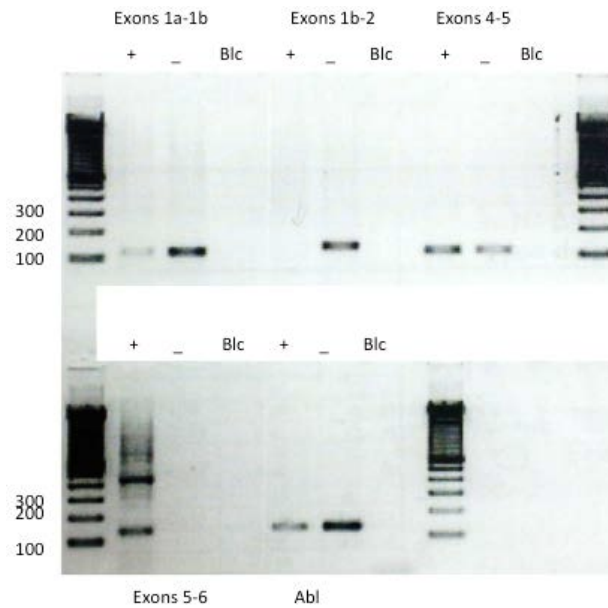


Figure 6-4 Migration des produits de RT-PCR sur gel d'agarose 2%, température d'hybridation 63°C

+ : témoin RUNX1-RUNX1T1 positif, - : témoin normal, Blc : blanc, contrôle de la réaction de PCR

- La programmation d'une hybridation à 65°C n'était plus adaptée puisque nous n'avions plus d'amplification détectable avec les amorces des exons 1b-2 et un faible amplicon au-dessus de 100 pb pour les exons 4-5 chez le témoin normal. En revanche, les amorces de RACE PCR montraient une migration efficace avec l'apparition d'une bande d'environ 200 pb (Exon4 3'RACE PCR) et d'une autre au-dessus de 100 pb (Exon4 3'RACE PCR nichée). Ces dernières amorces ont donc été validées pour cette température (figure 6-5).

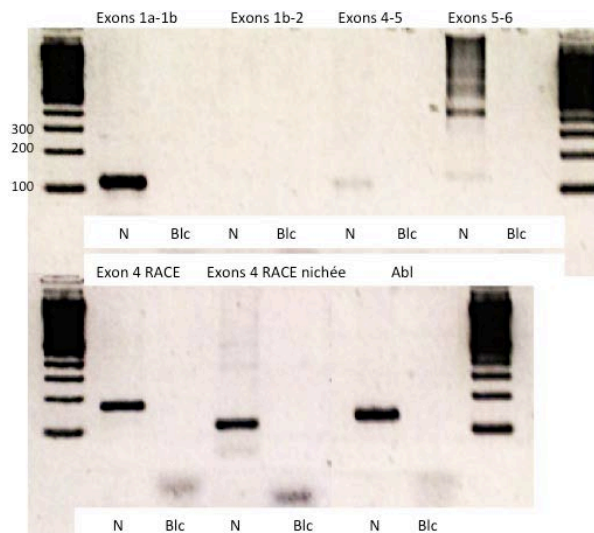


Figure 6-5 Migration des produits de RT-PCR sur gel d'agarose 2%, température d'hybridation 65°C

N : témoin normal, Blc : blanc, contrôle de la réaction de PCR

- Le cycle d'hybridation à 64°C testé sur les ADNc d'un témoin normal, d'un témoin RUNX1-RUNX1T1 positif, d'un témoin ETV6-RUNX1 positif et la patiente a mis en évidence une bande supérieure à 100 pb avec toutes les amorces pour les échantillons RUNX1-RUNXT1 positif, ETV6-RUNX1 positif et la patiente. Le patient négatif, ne donne pas de produits de migration avec les amorces des exons 1a-1b et 1b-2. Ce sont les migrations les plus exploitables pour l'ensemble des couples d'amorces de RQ-PCR et la température de 64°C a été retenue pour les réactions ultérieures. On note, malgré tout, la présence de bandes aspécifiques proches des 400 pb avec les amorces des exons 5-6 sur les quatre échantillons testés (figure 6-6).

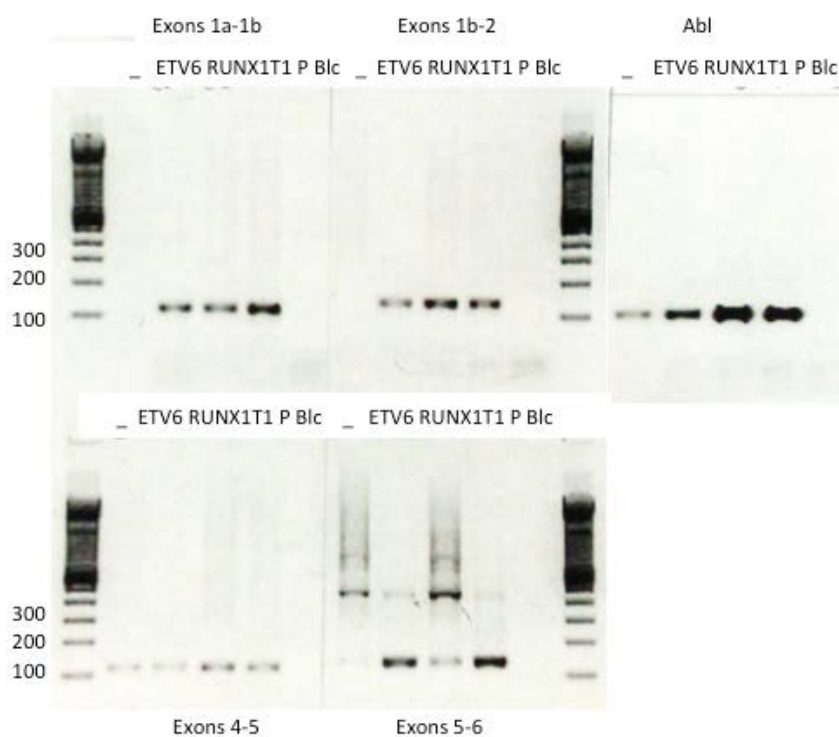


Figure 6-6 Migration des produits de RT-PCR sur gel d'agarose 2%, hybridation à 64°C

T : témoin normal, ETV6 : témoins ETV6-RUNX1 positif, RUNX1T1: témoin RUNX1-RUNX1T1 positif, P : échantillon de la patiente au diagnostic, Blc : blanc, contrôle de la réaction de PCR, Abl : Abelson, amplicon de contrôle interne (garantit la qualité de l'ARN si présence de produits d'amplification)

6.3 PCR quantitative

6.3.1 Plaque efficacité

La plaque d'efficacité a montré une amplification quantifiable dans tous les puits attendus. Les puits « blancs » témoins négatifs sont restés vierges, il n'y a donc pas eu de formation de dimères d'amorces. Les courbes de dissociation pour chaque couple d'amorce montraient un pic unique spécifique. Les droites d'efficacité par sonde oscillaient entre -3.04 et -3.45 pour l'ADNc de ETV6-RUNX1 et RUNX1-RUNX1T1 entre -3.601 et -3.815. La courbe de fusion de la réaction évaluait le Tm entre 76°C et 81°C.

6.3.2 Plaque test patiente

Après validation de la réaction, les résultats de la Q-PCR sont les suivants :

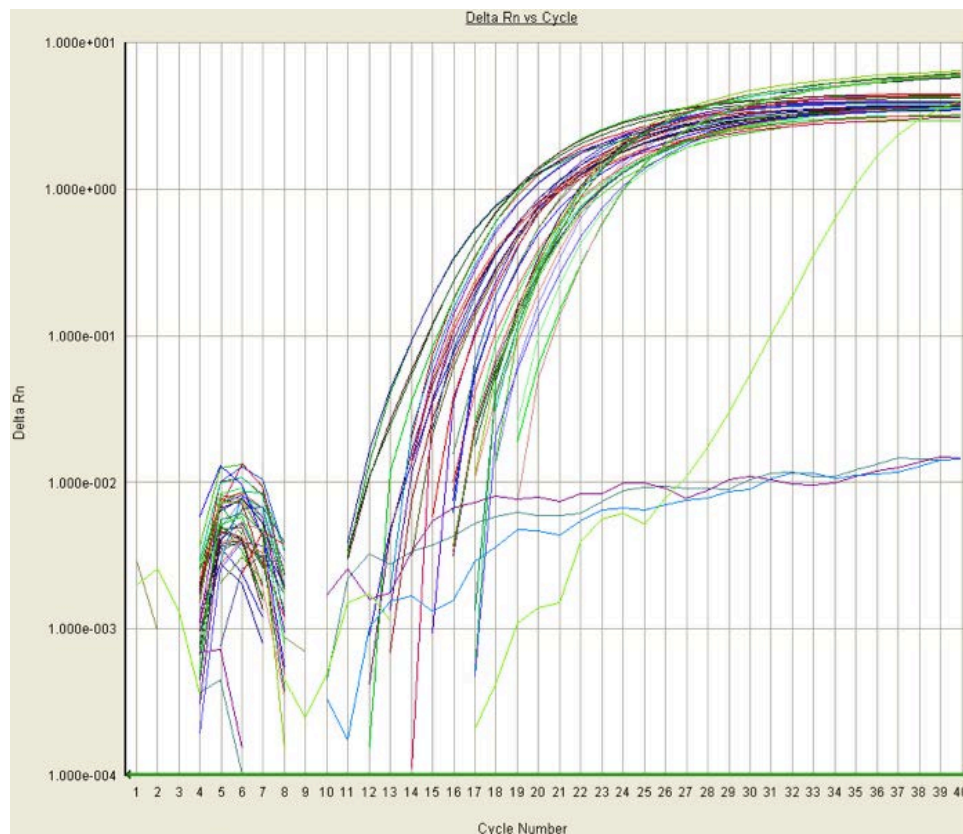


Figure 6-7 Courbes d'amplification plaque d'efficacité ensemble des amorces

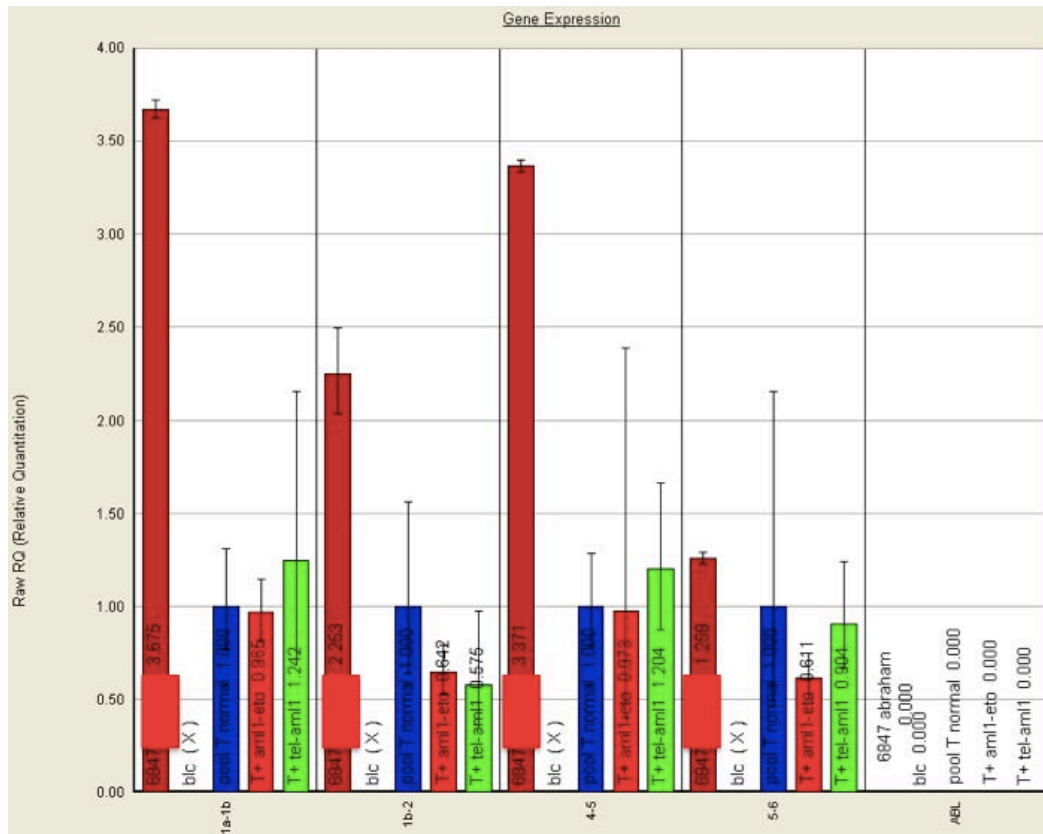


Figure 6-8 Quantification relative de l'expression de RUNX1 par Q-PCR SYBR® Green

Le pool T normal (colonne bleu) sert de calibrant de quantification et ABL sert de contrôle endogène. Axe des abscisse : exons quantifiés, axe des ordonnées : quantification relative. L'expression de RUNX1 chez la patiente est représentée par la colonne bordeaux. T+ aml1-eto : témoin RUNX1-RUNX1T1 positif (colonne rouge), T+ tel-aml1 : témoin ETV6-RUNX1 positif (colonne verte), Blc : blanc contrôle de la réaction de PCR

L'ADNc du pool normal permet de normaliser l'expression relative à 1. L'ADNc du témoin ETV6-RUNX1 est abaissée de moitié entre les exons 1a-1b et 1b-2. Ce constat coïncide avec les données de la littérature qui objectivent le point de cassure de la translocation t(12;21)(p13;q22) dans l'intron 1b de *RUNX1*. Le témoin RUNX1-RUNX1T1 présente deux baisses d'expression, l'une avec les amorces 1b-2 et l'autre avec les amorces 5-6. La perte d'expression de 37 % entre les exons 4 et 6 peut s'expliquer par le point de cassure au niveau de l'intron 5 de *RUNX1* dans la translocation t(8;21)(q22;q22). Néanmoins, la variabilité de l'expression entre les exons 1a et 5 reste relativement faible et peut être liée à la variabilité analytique. La quantification de *RUNX1* chez la patiente met, par contre, en évidence une forte expression des exons 1a à 5 (2 à 3 fois le pool normal et les leucémies témoins) et montre une diminution d'expression de 63 % entre les exons 4-5 et 5-6 ce qui suggère une cassure du gène dans cette région (figure 6-4).

6.4 Amplification rapide des extrémités d'ADNc (3'RACE)

6.4.1 PCR Abl : contrôle de la RT PCR

Le gel d'agarose met en évidence une bande de migration sur les deux échantillons testés, à savoir la patiente au diagnostic et le témoin RUNX1-RUNX1T1 positif. Cette bande de 138 pb correspond à l'amplification du gène *Abl*. La présence de produit de PCR signifie que la RT-PCR a bien généré de l'ADNc et que par conséquent l'oligo(dT) anchor primer est fonctionnelle. Le « blanc » de PCR ne montre pas d'amplicon validant la réaction (figure 6-9).

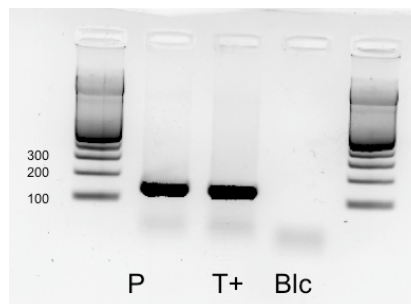


Figure 6-9 Migration des produits de la PCR Abl sur gel d'agarose 2%

P : patiente au diagnostic, T+ : témoins RUNX1-RUNX1T1 positif, Blc : blanc, contrôle de la réaction de PCR

6.4.2 3'RACE amplification

La réaction a été validée grâce aux « blancs » (figure 6-10). La migration des produits d'amplification 3'RACE avec gradient de température d'hybridation donne les résultats suivants :

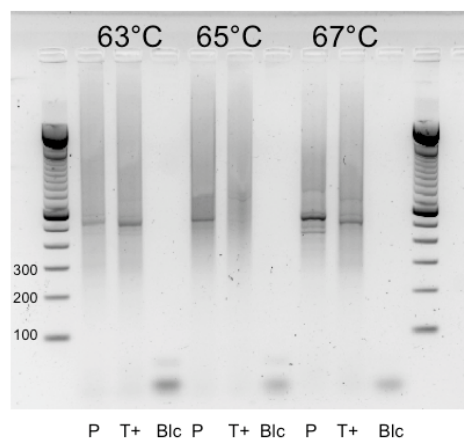


Figure 6-10 Migration des produits de la 3'RACE sur gel d'agarose 2%

Trois températures d'hybridation sont testées. P : patiente au diagnostic, T+ : témoin RUNX1-RUNX1T1 positif, Blc : blanc, contrôle de la réaction de PCR

La migration des amplicons de la patiente montre une bande au-dessus de 500 pb que l'on retrouve avec les trois températures d'hybridation. A 63°C une autre bande se détache aux alentours de 600pb et à 67°C deux bandes supplémentaires sont visibles à 400 et 500 pb.

Chez le témoin RUNX1-RUNX1T1 une bande se montre à 500 pb à 63 et 67°C. A ces températures une autre bande d'environ 600 pb se distingue. A 67°C apparaît une bande supplémentaire de 700 pb. La migration à 65°C ne montre pas de produits amplifiés. Le fragment d'ADN de 500 pb correspond au transcrit RUNX1-RUNX1T1.

6.4.3 3'RACE semi-nichée

La 3'RACE PCR semi-nichée a été réalisée sur les produits amplifiés de la patiente à 63 et 65°C et le témoin à 63°C. La réaction est validée par persistance des « blancs » dépourvus de produits de PCR (figure 6-11).

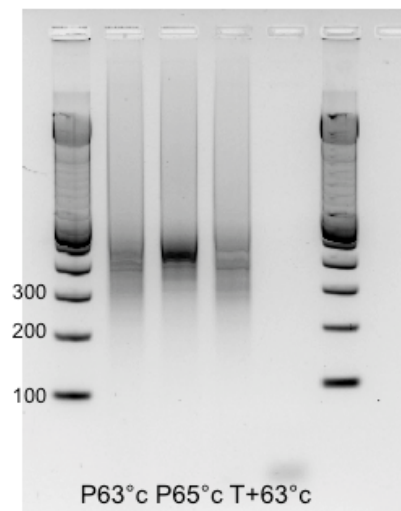


Figure 6-11 Migration des produits de 3'RACE PCR semi-nichée sur gel d'agarose 2%

P63°C : amplicons de la patiente préalablement amplifiée en 3'RACE PCR avec une température de 63°C, P65°C : amplicons de la patiente antérieurement hybridé à 65°C, T+63°C : produits d'amplification du témoin RUNX1-RUNX1T1 positif après la 3'RACE PCR à 63°C

Sur l'échantillon de la patiente amplifié à 63°C trois bandes principales se distinguent à 600, 500 et 400 pb. Ce profile ce rapproche des résultats obtenus à 67°C lors de la première amplification. La migration du produit de la patiente à 65°C ré-amplifié montre une large bande autour des 500 pb soulignée par une autre bande à 400 pb. La migration du produit de PCR semi-nichée sur le témoin RUNX1-RUNX1T1 à 65°C est ininterprétable.

6.5 Séquençage

6.5.1 Première réaction de séquençage

L'analyse des données avec le logiciel Sequencing Analysis (Applied Biosystem®) donne des électrophorégrammes où chaque pic correspond à un des quatre fluorochromes différents.

Le Raw data permet la visualisation des données brutes et d'avoir une appréciation générale de la fluorescence et de l'intensité du signal directement liée à la quantité de matrice initialement présente. Pour valider la séquence, l'intensité moyenne du signal de chaque fluorochrome doit être supérieure à 10-20 pour chaque ddNTP.

La première réaction de séquence n'a pas donné de séquence interprétable pour tous les échantillons testés.

Les produits de 3'RACE PCR : patiente 63°C et témoin 63°C et les produits de 3'RACE PCR semi-nichée avaient une séquence négative où aucune fluorescence spécifique n'a été enregistrée. La fluorescence basale était égale au bruit de fond.

Un début de séquence a pu être analysé sur l'échantillon de 3'RACE PCR patiente 65°C jusqu'à la base 221 du fragment d'ADN correspondant au gène RUNX1. Au delà, l'intensité de fluorescence est devenue trop faible pour pouvoir être interprétée. De plus, à partir de la 222^{ème} base l'analyseur montrait un mélange de deux séquences d'ADN.

6.5.2 Deuxième réaction de séquençage

La migration sur gel d'agarose haute résolution a donné les résultats suivants :

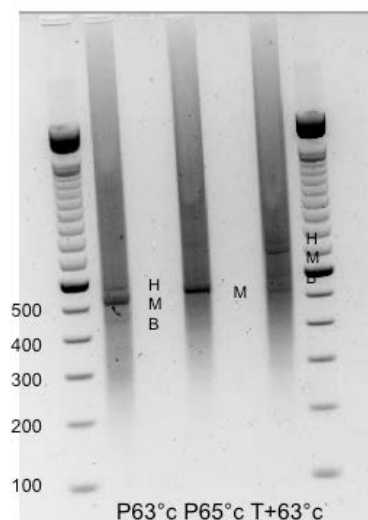


Figure 6-12 Migration des produits de la 3'RACE PCR semi-nichée sur gel d'agarose haute résolution à 2%

P63°C : amplicons de la patiente préalablement amplifiée en 3'RACE PCR avec une température de 63°C, P65°C : amplicons de la patiente antérieurement hybridé à 65°C, T+63°C : produits d'amplification du témoin RUNX1-RUNX1T1 positif après la 3'RACE PCR à 63°C

Pour l'échantillon de la patiente amplifié à 63°C trois bandes se distinguent à environ 600 pb (H), 500 pb (M) et 450 pb (B). A 65°C une seule bande au environ de 500 pb est retrouvée. Pour l'échantillon témoin deux bandes se détachent à 700 pb (H) et 500 pb (B) (figure 6-12).

La deuxième réaction de séquence a été réalisée sur 6 échantillons extraits du gel d'agarose haute résolution. Seul l'échantillon Patiente 65°C a montré une séquence lisible unique de 520 pb avec une intensité moyenne de fluorescence supérieure à 10-20 (figure 6-13).

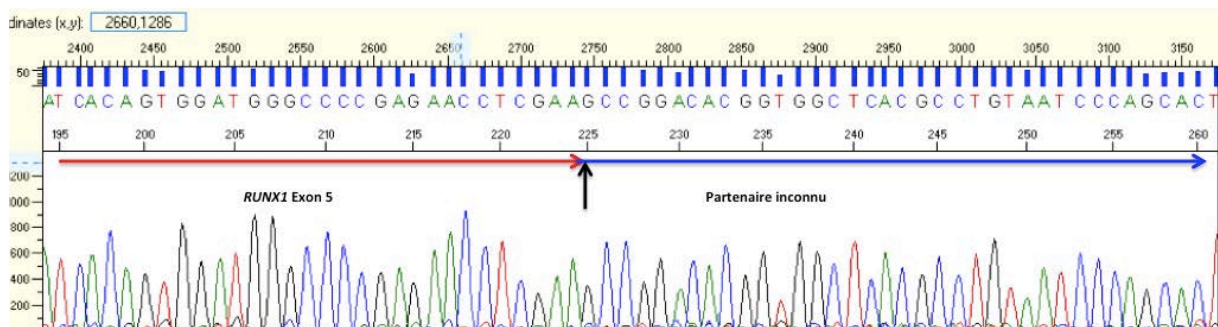


Figure 6-13 Electrophorégramme du produit de la 3'RACE PCR semi-nichée de la patiente (65°C)

Fusion de l'exon 5 de RUNX1 avec la séquence du partenaire inconnu

La séquence obtenue avec le logiciel Sequencing Analysis (Applied Biosystem®) (figure 6-14) à partir du produit de 3'RACE PCR semi-nichée (amplification avec hybridation à 65°C) issu de l'ARN de la patiente se traduit par :

```
TTCITTTGGTTTGTGAGGCTGGCATGATGAAACACTCGGCTGAAGGAAAAATGCTATGAGCCATGAAG
AACCAAGTTGCAAGATTTAATGACCTCAGGTTTTCGGTCGAAGTGAAGAGGGAAAAAGCTTCACTC
TGACCATCACTGTCTTCAAAAACCCACCGCAAGTCGCCACCTACCCACAGAGCCATCAAAATCACAGTG
GATGGGCCCGGAGAACCTCGAAGCCGGACACGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAG
GCCGAGGCCGGCTGATCAGGATCAGGAGATCGGGACCATCCTGGCTAACACGGTGAACCCCTGT
CTCTACTACAAATGCAAAAAAATTAGCGGGCGTGGTGGCAGGTGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGG
AGGCTGAGGCAGGAGAAATGGCGTGAACCCAGGAGGAGGTTGCAAGTGAAGCAAGATCGCGCCA
CCGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAA
```

RUNX1 Ex4 RUNX1 Ex 5 Inconnu

Figure 6-14 Séquence du produit de la 3'RACE PCR semi-nichée de la patiente (65°C)

6.6 Identification du transcrit

La séquence obtenue par séquençage est située en aval de l'exon 5 de *RUNX1*. Soumise à l'outil BLAT de la base de données Ensembl une similarité de 99.32% avec la région q21.13 du chromosome 8 : 82943149-82943443 (Human GRCh 38) est trouvée (figure 6-15 et 6-16).

BLAST/BLAT type	BLAT	Query	GCCGGACACGGTGGCTCACGCCGTAATCCCAGCACCTTGGGAGCCGAGGCCGGTGTAT
Query location	225 to 519 (+)	Subject	
Database location	8 82943149 to 82943443 (-)	Query	CACGAGATCAGGAGATCGGGACCATCCTGGCTAACACGGTGAAACCCCTGTCTACTACA
Genomic location	8 82943149 to 82943443 (-)	Subject	
Alignment score	574.0	Query	AATGCAAAAAAATTAGCCGGCCGTGGTGGCAGTGCCTGTAGTCCAGCTACTTGGGAGG
E-value	3.6e-164	Subject	
Alignment length	295	Query	CTGAGCAGGAGAATGGCGTGAACCCAGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCCAGATCGGCC
Percentage identity	99.32	Subject	
		Query	CACCGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAA
		Subject	
		Query	CTGAGCAGGAGAATGGCGTGAACCCAGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCCAGATCGGCC
		Subject	

Figure 6-15 Alignement de séquence d'après la base de données Ensembl

Cette séquence correspond à l'intron 2 du gène *RP11-731N10.1* qui, lorsqu'elle est transcrite, code pour un long ARN non codant intergénique (novel lincRNA) de 815 pb. Comme son nom l'indique cet ARN ne donne pas de protéine. Il n'y a donc pas de protéine chimérique de fusion fonctionnelle chez notre patiente.

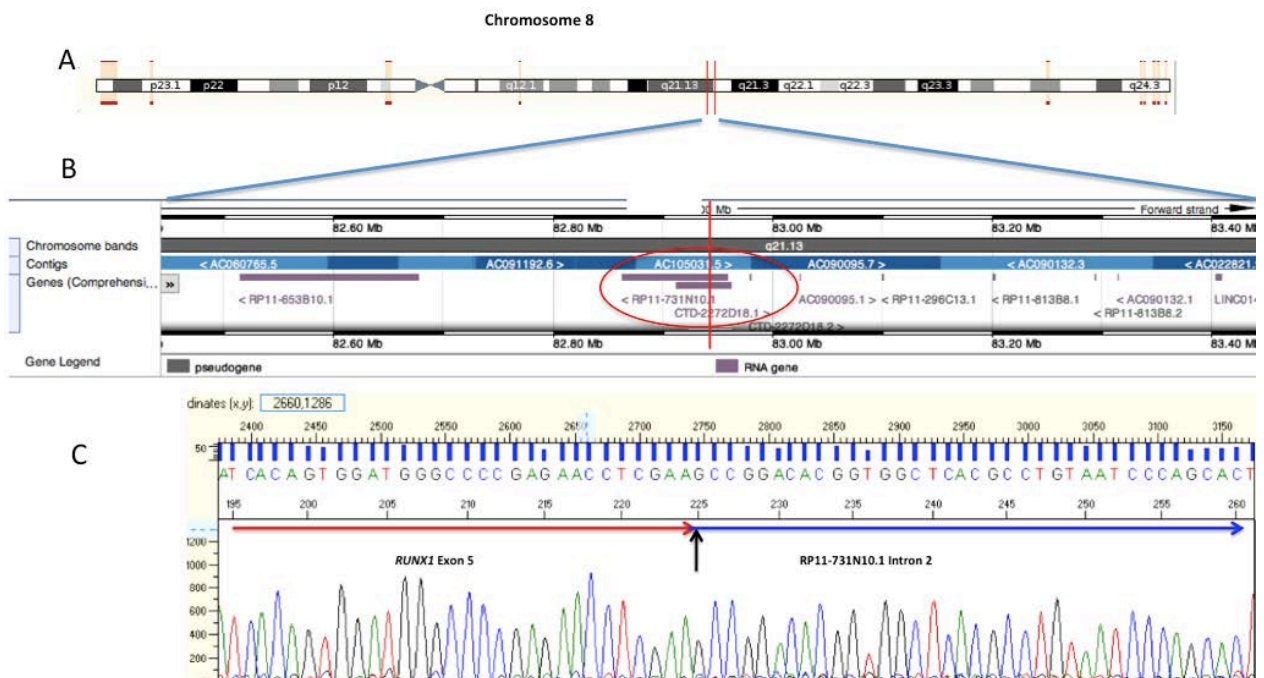


Figure 6-16 Identification du partenaire de *RUNX1* dans la translocation $t(8;21)(q22;q22)$ atypique : *RP11-731N10.1* , d'après la base de donnée Ensembl

Points de cassure de *RUNX1* dans l'intron 6 et dans l'intron 2 de *RP11-731N10.1*. (A) Schématisation du chromosome 8 et localisation de la séquence dans le bras long en q21.13. (B) A l'échelle du gène, présence de *RP11-731N10.1*, transcrit dans le même sens que *RUNX1* (reverse ou négatif). (C) Au niveau nucléotidique correspondance de la séquence obtenue en 3'RACE PCR avec l'intron 2 de *RP11-731N10.1*

7 Les longs ARNs non codant

Le projet de séquençage du génome humain a permis d'affirmer que seulement 2% de l'ADN génomique codent pour des protéines. Néanmoins, les deux tiers du génome sont transcrits en ARN (acide ribonucléotidique). Ce paradoxe de la « matière noire » ou « *junk DNA* » s'explique par l'existence de régions riches en transcrits codants pour des ARNs dépourvus de potentiel protéique. Ces ARNs non codants jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques dont l'hématopoïèse normale et pathologique (146).

7.1 Définition

Il existe tout un ensemble d'ARNs non codant dans lequel on trouve, par exemple, les ARNs ribosomiaux et les ARNs de transfert. Le reste du groupe est séparé en fonction de la taille du transcrit. Ainsi, on distingue :

- Les petits ncARNs (< 200 nucléotides) qui comprennent, entre autres, les micro-ARN (miARN), les ARN nucléaires (snARN) et les ARN nucléolaires (snoARN).
- Les longs ncARNs (>200 nucléotides) représentent un groupement divers d'ARNs dont certains sont polyadénylés, nucléaires ou cytoplasmiques. Tout comme les ARNs codant, beaucoup de lncARNs sont liés à des cellules spécifiques par des facteurs nucléaires et sont transcrits par des promoteurs puis épissés. D'autres, proviennent d'enhancers. On estime, qu'il y a plusieurs douzaines de lncARNs produits par le génome humain (146).

L'expression des ncARNs est plus faible que celle des ARNm produisant une protéine.

7.2 Classification

Les lncARNs sont classés en fonction de leurs localisations sur la séquence génomique (figure 7-1). Cinq groupes ont pu être définis (147).

7.2.1 lncARNs autonomes ou intergéniques

Ces ARN sont placés dans la séquence génomique mais ne chevauchent pas la séquence d'un gène codant pour une protéine. Ils sont donc indépendants. Ils sont transcrits par l'ARN

polymérase II, polyadénylés et épissés. Leur taille peut atteindre 1kb. Les lncARNs autonomes les plus connus sont : XIST (exemple traité plus bas dans les fonctions des lncARN), H19 et HOTAIR.

7.2.2 LncARNs anti-sens

La transcription de ces lncARNs semble se faire dans le sens opposé au brin d'ADN lié à l'unité de transcription. En fait, il existe des pairs sens/anti-sens d'lncARNs (SAS) et des anti-sens « naturel » enrichis aux extrémités 5' et 3' du transcrit sens.

7.2.3 Pseudogènes

Les pseudogènes sont des reliques de gènes. Ces lncARNs ont perdu leur potentiel codant protéique suite à des mutations non-sens, frameshift (mutations entraînant décalage du cadre de lecture) ou autres mutations. Ils sont des produits de la duplication en tandem de gènes ou d'ARNm pendant la rétransposition. La plupart des pseudogènes sont inertes. Cependant, certains sont transcrits et peuvent réguler l'expression de gènes par des mécanismes épigénétiques ou post-transcriptionnels. Ils posent par ailleurs de nombreux problèmes aux biologistes moléculaires de part leur grande homologie avec certains gènes codant pour des protéines.

7.2.4 LncARNs introniques

Les introns ne possèdent pas seulement les snoARNs et les miARNs. De longs transcrits ont été retrouvés au sein d'introns de gènes au potentiel protéique. Ces lncARNs semblent avoir des schémas d'expression différents et sont dérégulés dans les cancers.

7.2.5 LncARNs divergents

Ces transcrits bidirectionnels sont établis au voisinage des sites d'initiation de la transcription. Les lncARNs divergents sont polyadénylés et rapidement dégradés par les exosomes. On ne sait pas encore si ce sont de simples transcrits produits à partir des régions libres avoisinantes des promoteurs, si leur transcription intervient dans le maintien de l'ouverture de la chromatine ou encore si ces transcrits ont eux mêmes un rôle régulateur. Les enhancers produisent aussi des transcrits bidirectionnels.

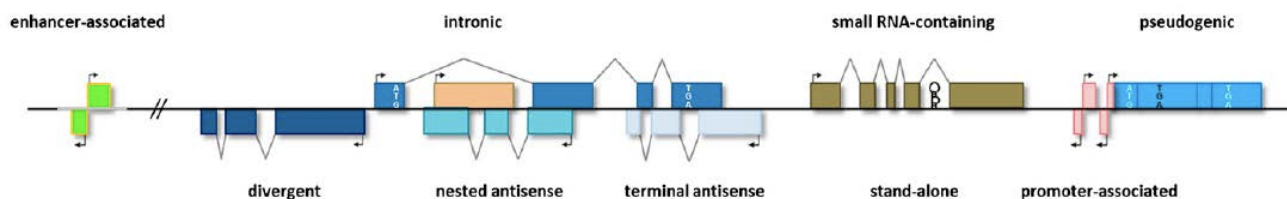


Figure 7-1 Contexte génomique de lncARNs (147)

7.3 Fonctions des lncARNs

Les lncARNs sont des molécules mouvantes qui ont la capacité d'interagir physiquement et fonctionnellement avec l'ADN mais aussi d'autres ARNs et des protéines. Cette interaction s'établit à travers l'appariement nucléotidique ou via la formation de domaines structuraux par repliement de l'ARN (146). Toutes les propriétés de ces lncARNs ne pas encore connues. Les modifications d'expression des lncARNs sont corrélées avec les processus développementaux et diverses maladies (147).

7.3.1 lncARN et régulation de l'expression génétique

La régulation de l'expression allélique est la fonction la mieux caractérisée. L'exemple le plus étudié est l'inactivation de X. En effet, chez la femme (46,XX) un des deux chromosome X est capable de produire un lncARN nommé XIST (*X inactivation specific transcript*) qui le couvre et recrute des complexes répresseurs condensateurs de chromatine comme PRC2 (*Polycomb repressive complexe 2*). Ce processus de mise au silence est appelé également lyonisation et se traduit par la formation du corpuscule de Barr. De la même manière l'empreinte parentale, processus par lequel un allèle est exprimé en fonction de l'origine parentale s'explique par la régulation de loci génomiques d'où émanent des lncARNs. De nombreux groupes soumis à empreinte contiennent des gènes codant pour une protéine et des lncARNs d'expression réciproque. Un autre exemple est celui du lncARN HOTAIR transcrit à partir du locus HOX C et qui induit le silence au locus HOX D par le recrutement intermédiaire de complexes répresseurs. HOTAIR introduit aussi la notion de régulation *en trans* c'est à dire d'action sur un autre chromosome que celui dont il est issu. A l'opposé, l'action sur un gène de voisinage est appelée régulation *en cis*. Les lncARNs peuvent interférer avec la liaison ADN-protéine, modifier l'architecture nucléaire, réguler la stabilité des ARNm et leur traduction, moduler le taux d'ARNm par compétition avec les micro-ARN et aussi altérer directement la fonction de la protéine (146).

7.3.2 LncARN et hématopoïèse normale

Les lncARNs sont impliqués dans le développement de plusieurs tissus en modulant la survie, la division et la différenciation cellulaire. De nombreuses études ont permis d'identifier plus d'une centaine de lncARNs concernés dans la régulation dans la biologie cellulaire et le développement des vertébrés.

Dans l'hématopoïèse peu de lncARNs ont été étudiés. LncARN-EPS est un lncARN nucléaire chez la souris. Durant l'érythropoïèse cet lncARN est activé et réprime le gène pro-apoptotique *Pycard*. LncARN EGO quant à lui régule l'expression des protéines des granulations éosinophiliques. HOTAIRM1 au niveau du groupe HOX A s'active pendant la myélopoïèse et est essentiel à l'induction d'HOX A et aux gènes de différenciation myéloïde.

En 2012, l'American Society of Hematology Annual Meeting a décrit des lncARNs dans les cellules souches hématopoïétiques, les cellules myéloïdes, les érythroblastes et les mégacaryocytes (146).

7.3.3 LncARN et maladie

Il a été montré que les lncARNs avaient un impact sur la transformation et la différenciation maligne. HOTAIR est bien connu pour son activation dans le cancer du sein et est associé à une invasion tissulaire intense et métastatique. Le lncARN p15AS est un anti-sens du gène suppresseur de tumeur *p15*. L'augmentation de l'expression de p15 AS est couplée avec la répression de p15 dans les LAM et les LAL. La délétion de XIST chez les femmes peut introduire un syndrome myéloprolifératif et myélodysplasique agressif, voir même une leucémie par le biais de dérégulation de gènes positionnés sur le deuxième chromosome X. Cette découverte est une piste étiologique qui pourrait expliquer la présence fréquente d'un chromosome X surnuméraire dans les hémopathies malignes (146).

7.4 Mécanismes d'action

L'action des lncARNs se fait à différents niveaux de l'expression des gènes (figure 7-2).

7.4.1 LncARN dans l'épigénétique

Les lncARNs ont la capacité de recruter des protéines de régulation de la chromatine. Ils peuvent fonctionner *en cis* en se liant aux gènes situés au voisinage du site de synthèse des ARNs ou *en trans* en régulant des gènes localisés dans des domaines distants ou sur un autre

chromosome. L'interaction entre lncARN et protéine de régulation peut se faire par recrutement, par des attaches ou par la constitution d'échafaudages permettant la connexion de plusieurs complexes protéiques en même temps. PCR2 (*Polycomb complex repressive 2*) est un complexe de modification de la chromatine qui interagit avec les lncARNs. Par exemple, HOTAIR peut interagir avec PCR2 et le complexe LSD1/CoREST/REST pour déméthyliser la lysine K4 de l'histone H3 et prévenir l'activation de gène. Le recrutement de facteurs impliqués dans l'activation génétique est aussi possible pour les lncARN. Mistral et HOTTIP sont deux lncARNs qui peuvent recruter MLL *en cis* depuis un ensemble de gènes proches de leurs loci. Mistral est capable de former des boucles chromosomiques ce qui facilite le rapprochement des lncARNs de leurs cibles. Hormis, les modifications d'histones, les lncARNs influencent la régulation épigénétique par modulation de méthylation de l'ADN au niveau des dinucléotides CpG par recrutement de DNMTs (ADN méthyltransférase) (147).

7.4.2 LncARN dans la transcription

Les lncARNs ont la capacité de modifier directement les processus de transcription. Certains agissent comme des leurres tandis que d'autres sont en compétition avec les facteurs de transcription. Les lncARNs peuvent eux-mêmes être des co-régulateurs de facteurs de transcription. Par exemple, le locus de la cycline D1 est à l'origine de différents transcrits de lncARNs de taille variable connus sous le nom de ncARN_{CCND1}. Ces derniers, lors d'une exposition au stress, s'activent, s'attachent à l'ADN et recrutent la protéine TLS. L'activité co-activatrice de p300/CBP de HAT est alors inhibée. Ainsi, les ncARN_{CCND1} sont à la fois des recruteurs et des effecteurs de TLS. De plus, la localisation cellulaire des facteurs de transcription peut aussi être influencée par les lncARNs. Enfin, les lncARNs peuvent en agissant au travers des facteurs de transcription, interférer directement avec l'activité de l'ARN polymérase II (147).

7.4.3 LncARN et compartiments nucléaires

Les compartiments nucléaires sont régulés par les lncARNs. Le noyau est une loge dynamique où de multiples acteurs, « corps nucléaires », jouent des rôles importants. Parmi eux, le nucléole est le siège de la transcription de l'ARN ribosomique et de l'assemblage des ribosomes. Mais le nucléole et le compartiment périnucléolaire sont les lieux où les lncARNs Xist et Kcnq1to1 agissent respectivement sur Xi (chromosome X inactivé) et le domaine Kcnq1 soumis à empreinte (147).

7.4.4 LncARN dans la régulation post-transcriptionnelle

Les processus d'élaboration et de maintien des ARN messagers (ARNm) peuvent être altérés par les lncARNs. L'épissage alternatif des transcrits peut être modifié par les lncARNs qui masquent les sites d'épissage. Au sein du cytoplasme les transcrits sont régulés au niveau de leur extrémité 3' par des facteurs qui altèrent leur stabilité. Ces mécanismes passent, notamment, par la dé-adénylation et la dégradation par les exosomes (complexes protéiques de dégradation des acides ribonucléiques). Certains lncARNs modifient la stabilité des transcrits d'ARNm par recrutement au niveau des AREs (*AU-rich elements*) des extrémités 3' de facteurs de stabilisation ou au contraire de déstabilisation. Il semblerait que la régulation de la traduction soit aussi affectée par les lncARNs. Par exemple, le facteur de transcription PU.1, impliqué dans l'hématopoïèse est négativement régulé au niveau protéique par le lncARN NAT (147).

7.4.5 Interaction longs et petits ncARNs

Les lncARNs et les petits ncARNs interagissent. Les micro-ARN et les lncARNs interviennent dans la stabilisation des ARNm. Ainsi, les lncARNs masquent les sites de liaison des miARNs sur les ARNm par compétition. Cependant, les lncARNs ont aussi la capacité de séquestrer comme une « éponge » les miARNs via des sites de liaison au niveau de leur extrémité 3' afin de les éloigner des ARNm cibles. Encore, les lncARNs peuvent eux-mêmes servir d'hôtes pour les miARNs (147).

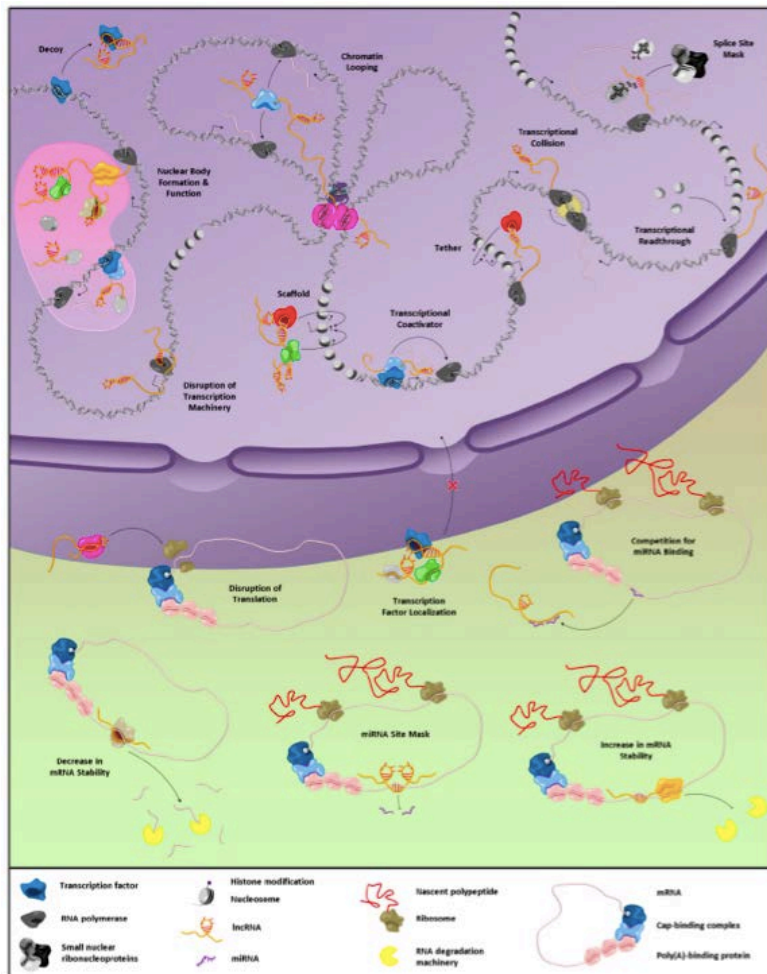


Figure 7-2 Mécanisme de fonction des lncARN (147)

7.5 L'exemple de RUNXOR

Une étude récente (148) a mis en évidence avec une technique de R3C (*RNA-guided Chromatin Conformation Capture*) un long ARN non codant intragénique nommé RUNXOR. Ce lncARN de 216 kb est transcrit depuis un promoteur situé environ 3kb en amont du promoteur 1 du gène *RUNX1*. La séquence de RUNXOR (pour *RUNX1 overlapping RNA*) couvre la séquence génomique de *RUNX1* et la transcription se fait dans la même direction. RUNXOR ne subit pas d'épissage, semble situé dans le compartiment nucléaire et possède de multiples points d'interactions avec l'ADN. L'intérêt de RUNXOR réside dans le fait que ce lncARN est activé dans les LAM et que son expression augmente, in vitro, lorsque les cellules sont soumises à un traitement par aracytine. De plus, RUNXOR a été retrouvé associé aux chromatines de chromosomes concernés dans les translocations récurrentes de *RUNX1*.

RUNXOR aurait une fonction importante dans la leucémogénèse car :

- Il possède la capacité de se lier aux éléments régulateurs de *RUNX1* (promoteurs et enhancers).
- RUNXOR s'associe directement à l'ADN et participe à l'interaction entre les deux promoteurs de *RUNX1* via la création de boucles intra-chromosomiques. Ce qui constitue un mécanisme de régulation épigénétique. Aussi, RUNXOR interagit avec EZH2 et la protéine *RUNX1*.
- Le promoteur de RUNXOR situé en amont du promoteur de *RUNX1* instaure un mécanisme de compétition en cis pour la régulation de la machinerie transcriptionnelle.
- RUNXOR est activé dans les LAM et est impliqué dans les translocations chromosomiques de *RUNX1* via son extrémité 3'.

RUNXOR apparaît donc comme un acteur essentiel dans la physiopathologie des hémopathies malignes.

8 Discussion

Dans ce travail, nous rapportons le cas d'une leucémie aiguë myéloïde, thérapie induite, avec une translocation $t(8;21)(q22;q22)$ impliquant le gène *RUNX1* et le long ARN non codant intergénique *RP11-731N10.1*. La translocation entraîne la fusion des cinq premiers exons de *RUNX1* (cassure au tout début de l'intron 6) avec une partie de l'intron 2 de *RP11-731N10.1*. Ce lncARN étant dépourvu de potentiel protéique, il n'a pas été retrouvé de protéine chimérique. Il s'agit du premier cas hématologique rapportant une translocation entre un gène du CBF et un lncARN.

Peu de données sont disponibles à propos de *RP11-731N10.1*. Sa séquence génomique comporte 6 exons. Une recherche dans la base de données informatique lncRNome (<http://genome.igib.res.in/lncRNome>) ne nous apporte pas beaucoup d'informations hormis la séquence du transcrite et sa structure secondaire (figure 8-1).

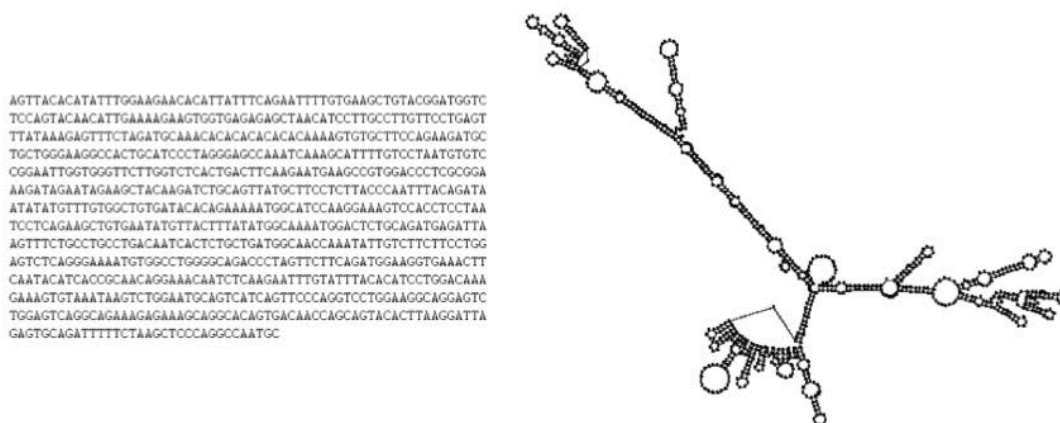


Figure 8-1 *RP11-731N10.1*, séquence du transcrite et structure secondaire d'après (<http://genome.igib.res.in/lncRNome>)

La séquence découverte ne s'aligne pas avec la séquence du transcrite issue de *RP11-731N10.1* car nous nous trouvons dans l'intron 2. Par définition les introns ne sont pas transcrits. La cassure génomique a pu provoquer une modification du signal d'épissage ce qui a entraîné la traduction aberrante de l'intron 2. Sachant que le lncARN *RUNXOR* ne subit pas d'épissage (148) un parallélisme peut être fait avec *RP11-731N10.1*. De plus, par l'approche que nous avons eu nous n'observons pas de séquence exonique de *RP11-731N10.1*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

- Le séquençage réalisé à partir de la RACE PCR est bornée par l'amorce Exon 4 nichée de *RUNX1* et l'oligo(dt) anchor primer de la RACE PCR. La présence d'une séquence

polyA dans la séquence intronique de *RP11-731N10.1* est possiblement à l'origine de ce biais.

- Le séquençage du mauvais amplicon. En effet, la migration sur gel haute résolution montrait sur l'échantillon Patiente 63°C un produit supplémentaire d'environ 600 pb. Cette séquence plus longue nous aurait peut être permis d'avoir un exon du lncARN.

Malgré l'absence de séquence exonique, l'alignement de la séquence du partenaire inconnu avec RP11-731N10.1 placé sur le chromosome 8, dans la région estimée du point de cassure et la fusion directe des séquences de *RUNX1* et du lncARN constituent un ensemble d'arguments qui écartent la suggestion d'une séquence homologue interférente avec notre amorce. Dans ce cas, nous n'aurions pas obtenu de produit d'amplification.

A l'heure actuelle, RP11-731N10.1 n'a pas d'implication décrite dans la régulation épigénétique ni d'interaction avec d'autres ARNs. On ne retrouve aucune étude sur ce lncARN dans la littérature.

8.1 La démarche suivie

Pour réaliser notre objectif nous sommes partis de résultats cytogénétiques « standard » pour ensuite cibler notre recherche à l'aide de techniques de biologie moléculaire. La démarche a été argumentée par différents articles de la littérature faisant l'objet d'une recherche de partenaires inconnus impliqués dans des translocations atypiques. Les études sélectionnées concernaient toutes un cas de leucémie aiguë associée avec un réarrangement du gène *RUNX1* (tableau 8-1).

Tableau 8-1 Publications avec recherche de partenaires inconnus dans des translocations atypiques impliquant *RUNX1* (149–152)

Auteurs	Date de publication	Méthodes utilisées	Hémopathie	Translocation	Partenaire impliqué
Giguère et al	2013	BAC Q-PCR 3' et 5' RACE PCR Séquençage RT-PCR	LAL Ph+	t(15;21)(q26.1;q22)	<i>RUNX1-SV2B</i>
Mikhail et al	2003	BAC 3'RACE PCR Notherblot Séquençage	LAL	t(4;21)(q28;q22)	<i>RUNX1-FGA7</i>
Paulsson et al	2006	BAC 3'RACE PCR RT-PCR	LAM	t(7;21)(p22;q22)	<i>RUNX1-USP42</i>
Zhang et al	2004	BAC Séquençage RT-PCR	LAM	t(X;21)(p22;q22)	<i>RUNX1-PRDX4</i>

L'article de Giguère.A et Hébert.J (149), en particulier, a été notre base de travail pour établir la méthodologie et le dessin des amorces. En effet, bien que nos amorces soient différentes de celles utilisées dans le papier de Giguère.A, elles ont été nommées et stratégiquement disposées le long de *RUNX1* comme dans leur étude de cas. Les amorces ont été dessinées en fonction de la séquence du transcrit variant 1 de *RUNX1* NM-001754.4, tout comme dans l'article de Paulsson.K et al (150).

L'utilisation en premier lieu des BACs nous a permis de préciser notre point de cassure sur le bras long du chromosome 8 et d'écarter les remaniements déjà décrits : en 8q13 dans une t-LAM sans gène partenaire déterminé (153), en 8q23 et 8q24 avec l'implication des gènes *FOG2* et *TRPS1* respectivement (129). Ces derniers points se situant en aval du gène *RUNX1T1*, ils n'est pas étonnant qu'ils ne soient pas concernés dans notre cas. La première série place le point de cassure dans une région d'environ 5 Mb qui correspond à la zone où se localise *RP11-731N10.1*. Cependant, une deuxième série de BACs, plus centrée autour du point de cassure présumé nous aurait permis d'augmenter la précision et d'appuyer la cohérence de nos résultats.

Les amorces ont été testées par plusieurs PCR classiques afin d'obtenir les meilleures températures de travail et accroître la spécificité de nos techniques. La température optimale retenue était de 64°C pour les amorces de Q-PCR et 65°C pour les amorces de RACE-PCR. Seul le couple d'amorce des exons 5-6 a montré un smear synonyme d'amplicons non spécifiques. Le risque d'employer cette paire d'oligonucléotides en Q-PCR était de surestimer la quantification des produits amplifiés entre les exons 5 et 6. En réalisant une Q-PCR, nous ne cherchions pas à avoir une quantification fine comme l'on doit obtenir dans le cadre d'un suivi de maladie résiduelle. Le but était de situer le point de cassure au niveau du gène *RUNX1* pour en déduire sa position, antérieure ou postérieure, par rapport au partenaire inconnu. En fonction de la disposition on pouvait déterminer de l'exécution d'une 3' ou 5' RACE PCR. De plus, nous avons observé, malgré le risque de surestimation, une baisse de 63% entre les produits des exons 4-5 et ceux des exons 5-6. La présence de moins d'amplicons entre les exons 5 et 6 traduisait une moindre amplification, par absence d'hybridation de l'amorce 6 et donc une probable cassure du gène *RUNX1* entre ces deux exons. Nous avons donc émis l'hypothèse de placer le gène *RUNX1* en 5' et le partenaire inconnu en 3' du produit de fusion. Cette hypothèse nous a conduit à la décision de réaliser une 3'RACE PCR.

L'utilisation du SYBR® Green pour la PCR quantitative en temps réel était motivée par les nombreux avantages que présente cet agent intercalant. Cette molécule est la plus fréquemment utilisée. Ce système de fluorescence est insensible à la présence de mésappariements d'ADN. De plus, la technique en SYBR® Green est économique et simple d'utilisation. En revanche, cet intercalant se place sans spécificité entre deux molécules

d'ADN double brins. Il n'y a donc pas de spécificité et le risque est d'obtenir des signaux parasites (142). C'est pour cela que le dessin d'amorce a été optimisé.

L'avantage principal de la méthode de quantification relative par comparaison des ΔCt est qu'elle ne nécessite pas la construction d'un standard. L'inconvénient majeur de ce moyen de calcul est qu'il repose sur la condition que les échantillons et le calibrant aient des efficacités d'amplifications égales (142). Ici, le pool témoin a servi de calibrant. La matrice étant la même (échantillons de patient) les efficacités d'amplifications étaient considérées comparables.

La plaque d'efficacité a validé nos amorces bien que les pentes des droites d'efficacité étaient inférieures à 3,3 sur le témoin ETV6-RUNX1 positif.

Les conditions de réalisation de la 3'RACE ont été adaptées à notre recherche en fonction des résultats déjà obtenus et ceux envisagés. D'une part, les transcrits de fusion des hémopathies n'excèdent pas 1kb. D'autre part, les fiches fournisseurs de la reverse transcriptase (SuperScript™ II) et de l'ADN polymérase (GoTaq® HotStart Polymerase) nous indiquaient des potentiels de production de 12.3 kb d'ADNc et 1.5 kb d'ADN respectivement. Nous avons donc décidé d'utiliser, dans un premier temps, ces deux réactifs dans les conditions préconisées par les fournisseurs, ce qui revenait aux protocoles déjà en mis en place au laboratoire. En cas d'échec, nous aurions alors suivi les conseils techniques du kit 5'/3' RACE Kit (ROCHE) nous indiquant l'utilisation de l'Expand Long Template PCR System (ROCHE) qui possède une ADN polymérase plus puissante. En revanche, ne connaissant pas la température optimale d'hybridation de la PCR anchor primer, l'étape d'amplification a été réalisée avec un gradient de température. Ce gradient nous a permis d'augmenter la spécificité de la RACE et donc nos chances d'amplifier le transcrit cible.

L'échec des réactions de séquençage peut être lié soit aux amorces, soit à la matrice d'ADN. Les amorces avaient déjà prouvé leurs spécificités et leur bon fonctionnement dans les réactions antérieures. Mais, il est aussi possible que la matrice d'ADN ait été en trop faible quantité ou quelle se soit dégradée entre les réactions de 3'RACE semi-nichée et le séquençage. La présence d'impuretés due à une purification insuffisante aurait pu aussi inhiber le fonctionnement de la Taq polymérase durant la réaction de séquence. La présence d'un mélange de plusieurs bases peut s'attribuer à une mauvaise qualité de préparation de la matrice provoquant l'interférence de contaminants. Aussi, un mélange de deux produits de PCR de tailles différentes peut se manifester par un signal double. Cette dernière hypothèse semble la plus plausible puisque la migration sur gel résolutif a montré l'existence de plusieurs produits d'amplifications dans un même échantillon. Les résultats de migration des produits sur gel sont cohérents. En effet, les échantillons de la patiente présentent sur les deux réactions de RACE PCR un amplicon d'environ 500 pb et l'on obtient par séquençage une séquence de 520 pb. De la même manière, le produit amplifié chez le témoin de 500 pb correspond au transcrit RUNX1-RUNX1T1. Habituellement, le produit de PCR amplifié pour la

détection du transcrit *RUNX1-RUNX1T1* fait 395 pb avec les amorces utilisées au laboratoire et dessinées selon les recommandations de l'European BIOMED-1 (154). Mais ici, nous avons employé des amorces différentes dont une placée à l'extrémité de l'ARNm ce qui explique l'obtention d'un produit de PCR plus long.

Après avoir identifié le partenaire de *RUNX1* dans la translocation t(8;21)(q22;q22) de notre cas, nous n'avons malheureusement pas pu réaliser de RT-PCR de contrôle afin de retrouver le transcrit avec un couple d'amorces disposé sur l'exon 4 de *RUNX1* et sur la séquence de *RP11-731N10.1*.

Dans la littérature d'autres techniques d'identification de partenaire inconnu existent. La panhandle PCR est souvent utilisée pour authentifier les multiples partenaires impliqués dans les remaniements de *MLL* (155). Cette méthode plus couteuse et plus compliquée nécessite au minimum quatre étapes (figure 8-2). La différence essentielle avec la 3'RACE PCR est que la panhandle utilise des hexamers aléatoires contenant une séquence du gène connu lors de l'étape de RT-PCR au lieu de l'oligo(dT) primer. Ainsi, le brin d'ADNc obtenu présente à ses deux extrémités une séquence du gène connu. Cette disposition va entraîner lors de la dénaturation la formation d'une boucle intra-brin. Bien que cette boucle fasse la grande spécificité de cette technique (156), l'utilisation d'hexamers aléatoires provoque la formation de produits multiples produits de PCR et de tailles différentes ce qui augmente la difficulté d'interprétation. De plus, la panhandle PCR est adaptée que lorsque le gène inconnu se trouve à l'extrémité 3' du gène connu. Hors, au début de notre travail nous ne savions pas précisément où se situait le partenaire par rapport à *RUNX1*. C'est pourquoi nous avons opté pour la RACE PCR.

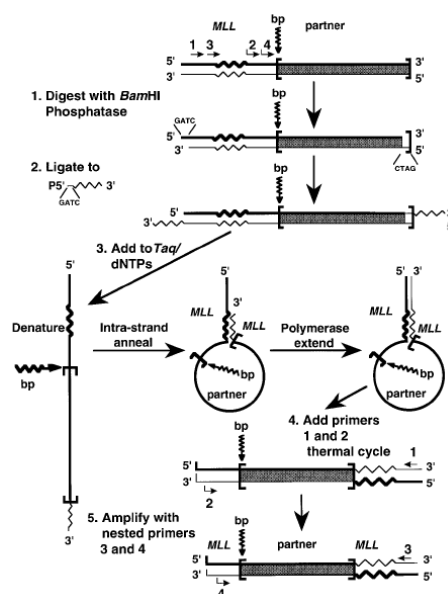


Figure 8-2 Stratégie schématique de la panhandle PCR (155)

Exemple pour amplifier le point de cassure génomique impliquant *MLL* (155)

La bubble PCR est une autre méthode alternative. Habituellement utilisée pour cloner des points de fusion génomiques, la bubble PCR a pu être adaptée pour identifier le partenaire de *RUNX1* dans une LAL pédiatrique à partir d'ADNc (157). Là encore, le coût et la complexité de la technique nous ont fait écarter cette méthode comme dernier recours en cas d'échec.

8.2 Mécanismes d'activation de *RUNX1* et leucémogénèse

L'activation de *RUNX1* et son rôle dans le développement leucémique chez la patiente ouvrent plusieurs portes de discussion. Notre cas rassemble différentes situations dans lesquelles de multiples mécanismes de leucémogénèse ont été démontrés.

Tout d'abord, il s'agit d'une leucémie thérapie induite associée à une translocation équilibrée du gène *RUNX1* impliquant ses exons 1 à 5 avec le bras long du chromosome 8. Le domaine Runt est donc conservé et le domaine d'activation perdu, ce qui laisse sous entendre un effet dominant négatif de *RUNX1* muté sur l'allèle natif.

Ensuite, la morphologie de LAM 0, pousse à se questionner sur la présence éventuelle de mutations au sein de *RUNX1*. Une mutation bi-allélique, souvent décrite dans les cas de LAM indifférenciée, induirait une perte de fonction de *RUNX1* et donc un défaut d'expression. Toutefois, cette interrogation reste sans réponse puisque nous n'avons pas exploré le deuxième allèle de *RUNX1* ni réalisé de séquençage complet du gène à la recherche de mutations ponctuelles.

Encore, la translocation entraîne la fusion de l'exon 5 de *RUNX1* avec l'intron 2 d'un nouveau lincARN : RP11-731N10.1. Comptes tenu des récentes découvertes concernant les longs ARNs non codant la piste d'un processus de régulation de l'expression allélique n'est pas à sous estimer (146). En effet, RP11-731N10.1 pourrait modifier l'expression de *RUNX1* à différents niveaux :

- **Au niveau épigénétique** : plusieurs mécanismes sont possibles avec le recrutement de complexes répresseurs de *RUNX1* via une régulation *en trans* ou une action sur la méthylation de la lysine K4 de l'histone H3 ou par modification de la méthylation de l'ADN au niveau des dinucléotides CpG.
- **Au niveau transcriptionnel** : les processus de transcription peuvent être altérés si RP11-731N10.1 agit comme un leurre ou entre en compétition avec les facteurs de transcriptions de *RUNX1*. RP11-731N10.1 peut aussi avoir une activité co-régulatrice.

- **Au niveau post-transcriptionnel** : RP11-731N10.1 peut modifier l'épissage alternatif des transcrits en masquant les sites d'épissage. Sachant que *PU.1* est régulé négativement au niveau protéique par le lncARN NAT, on peut émettre l'hypothèse que RP11-731N10.1 exerce un effet semblable.

Enfin, nous savons que la patiente ne présentait pas d'anomalie des gènes *FLT3*, *NPM1*, *CEBP α* et *MLL* mais nous ne connaissons pas son statut vis à vis d'autres gènes tels *RAS*, *KIT*, *IDH1*, *IDH2* et *WT1*. Le séquençage haut débit (NGS, *next generation sequencing*) aurait été la technique idéale pour avoir une vision d'ensemble des altérations moléculaires associées à la translocation t(8;21)(q22;q22) de la patiente.

Par ailleurs, en rapport au niveau d'expression de certains exons de *RUNX1* chez notre patiente, plusieurs compléments à ce travail peuvent être envisagé :

- l'expression de *RUNX1* est-elle associée à celle de *RP11-731N10.1* ?
- l'expression de *RP11-731N10.1* est-elle différente entre l'hématopoïèse normale et leucémique ?
- l'expression de *RP11-731N10.1* est-elle associée à des mutations de *RUNX1* ?

L'implication du lncARN *RUNXOR* est aussi à prendre en compte dans notre réflexion. L'étude de H.Wang (148) montre que *RUNXOR* est activé dans les LAM et qu'il est retrouvé au niveaux des chromosomes réarrangés par des translocations équilibrées. Puisqu'il couvre toute la séquence de *RUNX1* il est légitime de penser qu'il pourrait jouer un rôle dans notre cas.

9 Conclusion

Runt-related protein 1 (RUNX1) est un gène clé de la leucémogénèse. Son implication dans une translocation t(8;21)(q22;q22) sans atteinte du gène *RUNX1T1* chez une patiente prise en charge au CHU de Nancy à suscité notre intérêt. L'exploration de ce réarrangement atypique nous a mené à la découverte d'une fusion RUNX1- RP11-731N10.1. L'implication de ce nouveau lncARN est d'autant plus étonnante qu'elle concerne les cinq premiers exons de *RUNX1* et l'intron 2 de RP11-731N10.1.

A la lumière des dernières découvertes scientifiques, la présence de RP11-731N10.1 ouvre tout un champ de réflexions sur de nouveaux mécanismes d'activation de *RUNX1* et son rôle dans la leucémogénèse. La modification de la régulation de l'expression allélique par des actions à différents niveaux allant de l'épigénétique à la traduction semble être le rôle des ces long ARNs non codant, longtemps ignorés.

Les résultats de notre recherche restent cohérents malgré quelques imprécisions techniques qui auraient mérité d'être plus approfondies. Le recours à des techniques d'analyses globales de l'ADN comme le séquençage haut débit nous auraient vraisemblablement apporté des informations nécessaires à la compréhension du mécanisme d'action de RP11-731N10.1. Pour le moment nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses.

Enfin, la technique de 3'RACE PCR est adaptée à la recherche de partenaires inconnus impliqués dans des translocations.

Bibliographie

1. Piller GJ. Leukaemia—a brief historical review from ancient times to 1950. *British journal of haematology*. 2001;112(2):282–92.
2. Anonyme. Art.5171. Leucémie, leucocythémie. 1856 Avril;XXVII.
3. Gatta G, van der Zwan JM, Casali PG, Siesling S, Dei Tos AP, Kunkler I, et al. Rare cancers are not so rare: The rare cancer burden in Europe. *European Journal of Cancer*. 2011 Nov;47(17):2493–511.
4. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2008 Jun;56(3):159–75.
5. Visser O, Trama A, Maynadié M, Stiller C, Marcos-Gragera R, De Angelis R, et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *European Journal of Cancer*. 2012 Nov;48(17):3257–66.
6. Monnereau A, Remontet L, Maynadier M, Binder-Foucard F, Belot A, Troussard X, et al. Estimation-nationale-incidence-mortalite-par-cancer-France-1980-2012-Partie-2.pdf. 2013 Sep p. 57–62.
7. Maynadié M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Visser O, Allemani C, Tereanu C, et al. Survival of European patients diagnosed with myeloid malignancies: a HAEMACARE study. *Haematologica*. 2013 Feb;98(2):230–8.
8. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006 Nov 1;107(9):2099–107.
9. Pui C-H. Childhood leukemias. *New England Journal of Medicine*. 1995;332(24):1618–30.
10. Aquino VM. Acute myelogenous leukemia. *Curr probl pediatr*. 2002;32:50–8.
11. Chin-to F, Brodeur GM. Down's syndrome and leukemia: Epidemiology, Genetics, Cytogenetics and Mechanisms of leukomogenesis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1987;55–76.
12. Bruwier A, Chantrain CF. Hematological disorders and leukemia in children with Down syndrome. *Eur J Pediatr*. 2012 Sep;171(9):1301–7.
13. Swerdlow S., Campo E, Harris N., Jaffe E., Pileri S., Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.

14. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet.* 1999 Oct;23(2):166–75.
15. Dowton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP. Studies of a familial platelet disorder. *Blood.* 1985 Mar;65(3):557–63.
16. Fonatsch C. The role of chromosome 21 in hematology and oncology. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 2010;NA – NA.
17. Ichikawa M, Yoshimi A, Nakagawa M, Nishimoto N, Watanabe-Okochi N, Kurokawa M. A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia. *International Journal of Hematology.* 2013 Jun;97(6):726–34.
18. Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, et al. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia [Internet].* 2014 Apr 15 [cited 2014 Aug 2]; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2014.136>
19. Lanneaux J, Poidvin A, Soole F, Leclerc G, Grimaud M, Dalle J-H. [Fanconi anemia in 2012: diagnosis, pediatric follow-up and treatment]. *Arch Pediatr.* 2012 Oct;19(10):1100–9.
20. Pötzsch C, Voigtländer T, Lübbert M. p53 Germline mutation in a patient with Li-Fraumeni Syndrome and three metachronous malignancies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 2002 Aug 1;128(8):456–60.
21. Crane MM, Strom SS, Halabi S, Berman EL, Fueger JJ, Spitz MR, et al. Correlation between selected environmental exposures and karyotype in acute myelocytic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996 Aug;5(8):639–44.
22. Nakanishi M. Chromosomal instability in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome patients among atomic bomb survivors. *J Radiat Res.* 1999;159–67.
23. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet.* 2006;368(9550):1894–907.
24. Gundestrup M, Storm HH. Radiation-induced acute myeloid leukaemia and other cancers in commercial jet cockpit crew: a population-based cohort study. *The Lancet.* 1999;354(9195):2029–31.
25. Polychronakis I, Dounias G, Makropoulos V, Riza E, Linos A. Work-related leukemia: a systematic review. *J Occup Med Toxicol.* 2013;8(1):14.
26. Kane EV, Roman E, Cartwright R, Parker J, Morgan G. Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults. *British journal of cancer.* 1999;81(7):1228.

27. Zhang L, Rothman N, Li G, Guo W, Yang W, Hubbard AE, et al. Aberrations in chromosomes associated with lymphoma and therapy-related leukemia in benzene-exposed workers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2007 Jul;48(6):467–74.
28. Li K, Jing Y, Yang C, Liu S, Zhao Y, He X, et al. Increased leukemia-associated gene expression in benzene-exposed workers. *Scientific Reports* [Internet]. 2014 Jul 4 [cited 2014 Jul 19];4. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/srep05369>
29. Minder CE, Pfluger DH. Leukemia, brain tumors, and exposure to extremely low frequency electromagnetic fields in Swiss railway employees. *American journal of epidemiology*. 2001;153(9):825–35.
30. Roosli M, Lortscher M, Egger M, Pfluger D, Schreier N, Lortscher E, et al. Leukaemia, brain tumours and exposure to extremely low frequency magnetic fields: cohort study of Swiss railway employees. *Occupational and Environmental Medicine*. 2007 Aug 1;64(8):553–9.
31. Vanmaelefabry G, Duhayon S, Mertens C, Lison D. Risk of leukaemia among pesticide manufacturing workers: A review and meta-analysis of cohort studies. *Environmental Research*. 2008 Jan;106(1):121–37.
32. Hansen ES, Lander F, Lauritsen JM. Time trends in cancer risk and pesticide exposure, a long-term follow-up of Danish gardeners. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 2007 Dec;33(6):465–9.
33. Mahajan R, Blair A, Lynch CF, Schroeder P, Hoppin JA, Sandler DP, et al. Fonofos Exposure and Cancer Incidence in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives* [Internet]. 2006 [cited 2014 Oct 5]; Available from: <http://ehp.niehs.nih.gov/docs/2006/9301/abstract.html>
34. Orsi L, Delabre L, Monnereau A, Delval P, Berthou C, Fenaux P, et al. Occupational exposure to pesticides and lymphoid neoplasms among men: results of a French case-control study. *Occup Environ Med*. 2009 May;66(5):291–8.
35. Kerr JR, Barah F, Cunniffe VS, Smith J, Vallely PJ, Will AM, et al. Association of acute parvovirus B19 infection with new onset of acute lymphoblastic and myeloblastic leukaemia. *Journal of clinical pathology*. 2003;56(11):873–5.
36. Moore T, Brennan P, Becker N, de Sanjosé S, Maynadié M, Foretova L, et al. Occupational exposure to meat and risk of lymphoma: A multicenter case-control study from Europe. *International Journal of Cancer*. 2007 Dec 15;121(12):2761–6.
37. Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, Cole DC, Kaur JS, Kerr KJ. Cancer health effects of pesticides Systematic review. *Canadian Family Physician*. 2007;53(10):1704–11.

38. Hauptmann M, Stewart PA, Lubin JH, Beane Freeman LE, Hornung RW, Herrick RF, et al. Mortality From Lymphohematopoietic Malignancies and Brain Cancer Among Embalmers Exposed to Formaldehyde. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2009 Dec 16;101(24):1696–708.
39. Zhang L, Tang X, Rothman N, Vermeulen R, Ji Z, Shen M, et al. Occupational Exposure to Formaldehyde, Hematotoxicity, and Leukemia-Specific Chromosome Changes in Cultured Myeloid Progenitor Cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010 Jan 1;19(1):80–8.
40. Larsson SC, Wolk A. Overweight and obesity and incidence of leukemia: A meta-analysis of cohort studies. *International Journal of Cancer*. 2007 Nov 20;122(6):1418–21.
41. Puumala SE, Ross JA, Aplenc R, Spector LG. Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*. 2013 May;60(5):728–33.
42. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(15):1451–64.
43. Silver RT. The blast phase of chronic myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2009 Sep;22(3):387–94.
44. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1619–30.
45. Van Leeuwen FE. Risk of acute myelogenous leukaemia and myelodysplasia following cancer treatment. *Baillieres Clin Haematol*. 1996 Mar;9(1):57–85.
46. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:179–98.
47. Frohling S. Genetics of Myeloid Malignancies: Pathogenetic and Clinical Implications. *Journal of Clinical Oncology*. 2005 Sep 10;23(26):6285–95.
48. Chalandon Y, Schwaller J. Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies. *haematologica*. 2005;90(7):949–68.
49. Ahuja HG, Popplewell L, Tcheurekdjian L, Slovak ML. NUP98 gene rearrangements and the clonal evolution of chronic myelogenous leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001 Apr;30(4):410–5.
50. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *The Lancet*. 2013;381(9865):484–95.
51. Françoise Huguet, Christian Récher. Leucémies aigues de l'adulte. *Hematologie*.

2011;17(3):203–24.

52. Ferraro F, Celso CL, Scadden D. Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol*. 2010;695:155–68.

53. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*. 2009 Aug 6;114(6):1150–7.

54. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453–74.

55. Béné M., Lacombe F. Leucémies aiguës: immunophénotypage leucocytaire par cytométrie en flux. 2013 Sep;8(3):1–11.

56. Mason KD, Juneja SK, Szer J. The immunophenotype of acute myeloid leukemia: is there a relationship with prognosis? *Blood Reviews*. 2006 Mar;20(2):71–82.

57. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004 Jun;18(2):115–36.

58. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001 Sep;14(3):497–529.

59. GFCH. Recommandations pour la prise en charge cytogénétique des leucémies myéloïdes aiguës établies par le groupe français de cytogénétique hématologique. *Pathologie Biologie*. 2004;(52):248–50.

60. Mugneret F, Charrin C. Cytogénétique conventionnelle et moléculaire des leucémies aiguës. *Revue Française des laboratoires*. 2002 Juin;(344):31–40.

61. Pedoutour F. Chromosomes et caryotypes: cytogénétique constitutionnelle et tumorale. *Bulletin de la Division Française de l'AIP*. 2009 Juin;101–7.

62. Pedoutour F. Place de la FISH (hybridation in situ en fluorescence) dans les laboratoires de pathologie: aujourd'hui et demain...vue d'un laboratoire de cytogénétique. *Bulletin de la Division Française de l'AIP*. 2013 Juin;1–8.

63. Pedoutour F. Cytogénétique moléculaire directe: Hybridation in situ en fluorescence ou FISH. *Bulletin de la Division Française de l'AIP*. 2009 Juin;108–12.

64. Preudhomme C, Llopis L, Boissel N. Classification et facteurs pronostiques des leucémies aiguës. *EMC - Hématologie*. 2012 Feb;7(1):1–17.

65. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic

nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(3):254–66.

66. Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular Genetics of Adult Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and Therapeutic Implications. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Feb 10;29(5):475–86.

67. Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008 Jul;93(7):976–82.

68. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2386–92.

69. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBP Differentiation Pathway in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008 Dec 15;27(4):619–28.

70. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia*. 2005 Mar;19(3):329–34.

71. Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, Jeromin S, Grossmann V, Eder C, et al. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia*. 2014 Apr;28(4):794–803.

72. Zandecki M. Leucémies aiguës myéloïdes. *Hematocell.fr Laboratoire d'hématologie Cellulaire du CHU d'Angers*. 2011.

73. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. 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*. 2010 Jul 22;116(3):354–65.

74. Huret J-L. MLL (myeloid/lymphoid ou mixed lineage leukemia). *Atlas of Genetics Cytogenetic Onco-Haematology*. 2006;2(10):83–7.

75. Appelbaum FR. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3481–5.

76. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009 Apr 30;113(18):4179–87.

77. Löwenberg B. Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2001 Mar;14(1):65–75.

78. Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, Verstovsek S, Thomas D, et al. The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2007 Feb;136(4):624–7.
79. Godley LA, Larson RA. Therapy-related myeloid leukemia. *Semin Oncol*. 2008 Aug;35(4):418–29.
80. Larson RA, Le Beau MM. Therapy-related myeloid leukaemia: A model for leukemogenesis in humans. *Chemico-Biological Interactions*. 2005 May;153-154:187–95.
81. Haferlach T. Morphologic Dysplasia in De Novo Acute Myeloid Leukemia (AML) Is Related to Unfavorable Cytogenetics but Has No Independent Prognostic Relevance Under the Conditions of Intensive Induction Therapy: Results of a Multiparameter Analysis From the German AML Cooperative Group Studies. *Journal of Clinical Oncology*. 2003 Jan 15;21(2):256–65.
82. Preudhomme C, Leroy H, Botton SD. Facteurs biologiques du pronostic des leucémies aiguës myéloïdes. *Hématologie*. 2004 Jan 1;10(1):59–67.
83. Sanz MA, Sempere A. Immunophenotyping of AML and MDS and detection of residual disease. *Baillieres Clin Haematol*. 1996 Mar;9(1):35–55.
84. Casasnovas RO, Slimane FK, Garand R, Faure GC, Campos L, Deneys V, et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia*. 2003 Mar;17(3):515–27.
85. Cuneo A, Ferrant A, Michaux JL, Boogaerts M, Demuyneck H, Van Orshoven A, et al. Cytogenetic profile of minimally differentiated (FAB M0) acute myeloid leukemia: correlation with clinicobiologic findings. *Blood*. 1995 Jun 15;85(12):3688–94.
86. Béné M-C, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Doekharan D, Van Der Holt B, et al. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *British journal of haematology*. 2001;113(3):737–45.
87. Kao H-W, Liang D-C, Wu J-H, Kuo M-C, Wang P-N, Yang C-P, et al. Gene Mutation Patterns in Patients with Minimally Differentiated Acute Myeloid Leukemia. *Neoplasia*. 2014 Jun;16(6):481–8.
88. Bloomfield CD, Goldman A, Hassfeld D, de la Chapelle A. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1984 Mar;11(3):332–50.

89. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000 Dec 15;96(13):4075–83.
90. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4325–36.
91. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2322–33.
92. Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;385–95.
93. Bacher U, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Schoch C. Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2005 Nov;90(11):1502–10.
94. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Dec 20;30(36):4515–23.
95. Krzysztof Morzek, Clara D Bloomfield. Chromosome Aberrations, Genes mutations and Expression Changes and Prognosis in acute Myeloid Leukemia. *Hematology*. 2006;169–77.
96. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):431–48.
97. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3733–9.
98. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006 May 15;107(10):4011–20.

99. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008 May 1;358(18):1909–18.
100. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004 Feb 15;22(4):624–33.
101. Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Vukosavljevic T, Paschka P, et al. Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2008 Nov 1;26(31):5078–87.
102. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer*. 2009 Apr 21;100(8):1343–6.
103. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, et al. 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*. 2006 Aug 20;24(24):3904–11.
104. Valk PJM, Verhaak RGW, Beijen MA, Erpelinck CAJ, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004 Apr 15;350(16):1617–28.
105. Guièze R, Renneville A, Cayuela JM, Abdelali RB, Boissel N, de Botton S, et al. Prognostic value of minimal residual disease by real-time quantitative PCR in acute myeloid leukemia with CBFβ-MYH11 rearrangement: the French experience. *Leukemia*. 2010;24(7):1386–8.
106. Tang J-L, Hou H-A, Chen C-Y, Liu C-Y, Chou W-C, Tseng M-H, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*. 2009 Dec 17;114(26):5352–61.
107. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1613–8.
108. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CAJ, Valk PJM, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4329–37.

109. Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Whitman SP, et al. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 20;23(36):9234–42.
110. Langer C, Marcucci G, Holland KB, Radmacher MD, Maharry K, Paschka P, et al. Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 1;27(19):3198–204.
111. Schaich M, Soucek S, Thiede C, Ehninger G, Illmer T, SHG AML96 Study Group. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2005 Feb;128(3):324–32.
112. Guo X, Shi P, Chen F, Zha J, Liu B, Li R, et al. Low MDR1 and BAALC expression identifies a new subgroup of intermediate cytogenetic risk acute myeloid leukemia with a favorable outcome. *Blood Cells Mol Dis*. 2014 Sep;53(3):144–8.
113. Perea G, Lasa A, Aventín A, Domingo A, Villamor N, Queipo de Llano MP, et al. Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)]. *Leukemia*. 2006 Jan;20(1):87–94.
114. Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2008 Jan 1;112(1):4–16.
115. Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, Grossmann V, Schindela S, Dicker F, et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):129–37.
116. Smith SM. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003 Mar 20;102(1):43–52.
117. Slovak ML, Bedell V, Popplewell L, Arber DA, Schoch C, Slater R. 21q22 balanced chromosome aberrations in therapy-related hematopoietic disorders: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Apr;33(4):379–94.
118. Cowell IG, Austin CA. Mechanism of Generation of Therapy Related Leukemia in Response to Anti-Topoisomerase II Agents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2012 May 31;9(12):2075–91.
119. Seedhouse C, Russell N. Advances in the understanding of susceptibility to treatment-related acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2007 Jun;137(6):513–29.

120. Zhang L, Wang SA. A focused review of hematopoietic neoplasms occurring in the therapy-related setting. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(7):3512–23.
121. Broecker PL, Super HG, Thirman MJ, Pomykala H, Yonebayashi Y, Tanabe S, et al. 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*. 1996;87(5):1912–22.
122. Strissel PL, Strick R, Tomek RJ, Roe BA, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. DNA structural properties of AF9 are similar to MLL and could act as recombination hot spots resulting in MLL/AF9 translocations and leukemogenesis. *Hum Mol Genet*. 2000 Jul 1;9(11):1671–9.
123. Zhang Y, Strissel P, Strick R, Chen J, Nucifora G, Le Beau MM, et al. 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 USA*. 2002 Mar 5;99(5):3070–5.
124. Levanon D, Glusman G, Bangsow T, Ben-Asher E, Male DA, Avidan N, et al. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene*. 2001;262(1):23–33.
125. Kurokawa M, Hirai H. Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer science*. 2003;94(10):841–6.
126. Lam K, Zhang D-E. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2012;17:1120.
127. Koh CP, Wang CQ, Ng CEL, Ito Y, Araki M, Tergaonkar V, et al. RUNX1 meets MLL: epigenetic regulation of hematopoiesis by two leukemia genes. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1793–802.
128. Giguère A. Caractérisation clinique et moléculaire de nouvelles translocations chromosomiques ciblant le gène RUNX1 dans les leucémies aiguës de l'adulte. Université de Montréal; 2012.
129. De Braekeleer E, Férec C, De Braekeleer M. RUNX1 translocations in malignant hemopathies. *Anticancer Res*. 2009 Apr;29(4):1031–7.
130. Huret J-L, Senon S. AML1(acute myeloid leukemia 1)-RUNX1(runt related transcription factor 1 (acute myéloid leukemia;aml1 oncogene))-CBFA2 (core binding factor A2). *Atlas of Genetics Cytogenetic Onco-Haematology*. 2003;7(2):84–7.
131. Park IJ, Park JE, Kim HJ, Jung HJ, Lee WG, Cho SR. Acute myeloid leukemia with t(16;21)(q24;q22) and eosinophilia: case report and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Jan 1;196(1):105–8.

132. De Braekeleer É, Douet-Guilbert N, Le Bris M-J, Morel F, Férec C, De Braekeleer M. RUNX1-MTG16 fusion gene in acute myeloblastic leukemia with t(16;21)(q24;q22): case report and review of the literature. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2008 Aug;185(1):47–50.
133. Mangan JK, Speck NA. RUNX1 mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1-2):77–91.
134. Osato M, Asou N, Abdalla E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, et al. Biallelic and Heterozygous Point Mutations in the Runt Domain of the AML1/PEBP2 B Gene Associated With Myeloblastic Leukemias. *Blood*. 1999;93(6):1817–24.
135. Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia*. 2003;17(1):9–16.
136. Osato M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene*. 2004 May 24;23(24):4284–96.
137. Khac FN, Bernard OA. Conséquences moléculaires et fonctionnelles des anomalies chromosomiques des hémopathies malignes humaines. *Pathologie Biologie*. 2003 Aug 1;51(6):382–9.
138. Robinson HM, Harrison CJ, Moorman AV, Chudoba I, Strefford JC. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) may arise from a breakage-fusion-bridge cycle. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 Apr;46(4):318–26.
139. Huang G, Zhao X, Wang L, Elf S, Xu H, Zhao X, et al. The ability of MLL to bind RUNX1 and methylate H3K4 at PU.1 regulatory regions is impaired by MDS/AML-associated RUNX1/AML1 mutations. *Blood*. 2011 Dec 15;118(25):6544–52.
140. Kim H-G, Guzman CG de, Swindle CS, Cotta CV, Gartland L, Scott EW, et al. The ETS family transcription factor PU.1 is necessary for the maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood*. 2004 Dec 15;104(13):3894–900.
141. Shizuya H, Kouros-Mehr H. MINIREVIEW SERIES FOR THE 50TH. *Keio J Med*. 2001;50(1):26–30.
142. Ameziane N, Bogard M, Lamoril J. Principe de biologie moléculaire en biologie clinique. Elsevier; 2006. 705 p.
143. Delabesse E, Asnafi V, Macintyre E. Application à l'hématologie maligne des techniques de biologie moléculaire. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2003 Oct;10(5):335–52.

144. Tse C, Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales De Biologie Clinique*. 2003;279–93.
145. Van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans P a. S, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2257–317.
146. Paralkar VR, Weiss MJ. Long noncoding RNAs in biology and hematopoiesis. *Blood*. 2013 Jun 13;121(24):4842–6.
147. Kung JTY, Colognori D, Lee JT. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. *Genetics*. 2013 Mar 1;193(3):651–69.
148. Wang H, Li W, Guo R, Sun J, Cui J, Wang G, et al. An intragenic long noncoding RNA interacts epigenetically with the RUNX1 promoter and enhancer chromatin DNA in hematopoietic malignancies. *Int J Cancer*. 2014 Apr 20;
149. Giguère A, Hébert J. Identification of a novel fusion gene involving RUNX1 and the antisense strand of SV2B in a BCR-ABL1-positive acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Dec;52(12):1114–22.
150. Paulsson K, Békássy AN, Olofsson T, Mitelman F, Johansson B, Panagopoulos I. 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*. 2006 Feb;20(2):224–9.
151. Zhang Y, Emmanuel N, Kamboj G, Chen J, Shurafa M, Van Dyke DL, et al. 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 and Cancer*. 2004 Aug;40(4):365–70.
152. Mikhail FM, Coignet L, Hatem N, Mourad ZI, Farawela HM, El Kaffash DM, et al. 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*. 2004 Feb;39(2):110–8.
153. Nguyen TT, Ma LN, Slovak ML, Bangs CD, Cherry AM, Arber DA. Identification of novel Runx1 (AML1) translocation partner genes SH3D19, YTHDF2, and ZNF687 in acute myeloid leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2006 Oct;45(10):918–32.
154. Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999 Dec;13(12):1901–28.

155. Felix CA, Jones DH. Panhandle PCR: a technical advance to amplify MLL genomic translocation breakpoints. *Leukemia*. 1998 Jun;12(6):976–81.
156. Megonigal MD, Rappaport EF, Wilson RB, Jones DH, Whitlock JA, Ortega JA, et al. Panhandle PCR for cDNA: a rapid method for isolation of MLL fusion transcripts involving unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Aug 15;97(17):9597–602.
157. Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, et al. 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*. 2008 Apr 3;27(15):2249–56.

Annexe

Extraction d'ARN au Trizol®

Laboratoire de génétique CHU Nancy

Cette technique permet d'isoler les ARN totaux à partir de cellules issues de prélèvements sanguins ou médullaires à l'aide de Trizol®. Ce réactif est une solution monophasique de phénol de d'isothiocyanate de guanidine qui permet d'isoler des ARN. Cette technique est basée sur la différence de solubilité des acides nucléiques en fonction du pH en milieu aqueux.

Homogénéisation : Cette étape lyse les cellules et libère des acides nucléiques. Il y a formation de complexes entre l'ARN et l'isothiocyanate de guanidine puis rupture des interactions hydrophiles entre les protéines et l'ADN. A noter que les ARN sont solubles dans l'eau.

Sous sorbone après décongélation des cryotubes contenant les cellules en Trizol® (INVITROGEN, réf : 3478H), transférer 500 µl dans un tube Eppendorf de 1.5ml stérile . Ajouter 500 µl de Trizol® dans le tube Eppendorf et dans le cryotube qui seront traités de manière identique en parallèle.

Phase de séparation par addition de chloroforme (AnalaR Normapur VWR, réf : 22711290) : La phase aqueuse supérieure contient l'ARN et la phase organique inférieure rosée contient les protéines . L'ADN est à l'interface.

Ajouter 200 µl de chloroforme (pour 1ml de Trizol®) et homogénéiser par agitation.

Vortexer 15 secondes et laisser reposer à température ambiante 2 à 3 minutes.

Centrifuger 15 minutes à 12000 g à 4°C (centrifugeuse JOUAN MR1822). Transférer la phase aqueuse dans un tube Eppendorf de 1.5 ml.

Précipitation de l'ARN par addition d'isopropanol anydrous (Merck, réf : 1009940500) :

Ajouter 500 µl d'isopropanol (pour 1ml de Trizol®) et incuber à -20°C de quelques heures à une nuit.

Lavage de l'ARN par addition d'éthanol 75% (AnalaR Normapur VWR/PROLABO, réf : 20821.365) :

Centrifuger 10 minutes à 12000 g à 4°C, éliminer le surnageant et rincer le culot d'ARN avec 1 ml d'éthanol 75% (pour 1 ml de Trizol®).

Puis centrifuger pendant 5 minutes à 7500 g à 4°C.

Éliminer l'alcool et rajouter 500 µl d'éthanol 75% dans chacun des tubes traités en parallèle et les rassembler.

Re-centrifuger 5 minutes à 7500g à 4°C et éliminer le surnageant.

Séchage de l'ARN :

Laisser sécher le culot d'ARN par retournement sur papier absorbant jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de traces d'éthanol.

Mise en solution de l'ARN :

Re-suspendre l'ARN dans de l'eau milliQ (EUROBIO, réf : GAUDEAU OOF-01). Le volume est à adapter en fonction de la taille du culot (de 30 µl à 100 µl).

Conservation : Après avoir dosé l'ARN par spectrophotométrie (Nanodrop) celui-ci sera conservé à -80°C.

VU

NANCY, le **10 octobre 2014**

Le Président de Thèse

NANCY, le **13 octobre 2014**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur H. COUDANE

Professeur P. JONVEAUX

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE/6722

NANCY, le 21/10/2014

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Par délégation

Monsieur M. DELIGNON

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des maladies rares dont l'incidence augmente. Ces hémopathies ont bénéficié des progrès des sciences et des techniques. La cytogénétique conventionnelle et la biologie moléculaire ont permis d'améliorer les connaissances de la leucémogénèse et de stratifier les LAM en groupes de risque. La cytogénétique est le facteur pronostic le plus fort. *RUNX1*, essentiel à l'hématopoïèse, est l'un des gènes le plus remanié dans les LAM. Les réarrangements impliquent, entre autres, des translocations et des mutations qui amènent à des mécanismes divers d'activation (effet dominant négatif, haploinsuffisance). Plus, récemment, des études ont attribué un rôle important aux longs ARNs non codant (lncARN) notamment dans la régulation épigénétique. L'implication des lncARN dans l'hématopoïèse semble non négligeable.

Notre intérêt s'est porté sur un cas de LAM0, thérapie induite, présentant une translocation atypique t(8;21)(q22;q22) n'impliquant pas le gène *RUNX1T1*. Notre objectif a été d'identifier le gène partenaire de *RUNX1* dans ce réarrangement.

Pour cela nous avons utilisé différentes techniques de cytogénétique conventionnelle et de biologie moléculaire. L'amplification rapide par l'extrémité 3' (3'RACE PCR) suivie d'une réaction de séquençage nous a permis d'identifier le partenaire inconnu.

Nous avons mis en évidence un transcrite de fusion *RUNX1-RP11-731N10.1*.

RP11-731N10.1 est un lncARN peu connu qui ne code pas pour une protéine. Il n'y a donc pas de protéine chimérique fonctionnelle issue de cette translocation t(8;21)(q22;q22).

L'implication d'un lncARN ouvre un champ de réflexions sur de nouveaux mécanismes d'activation de *RUNX1* (de la régulation épigénétique à la traduction) et son rôle dans la leucémogénèse.

TITRE EN ANGLAIS : Identification of *RUNX1* partner in acute myeloid leukemia with atypical translocation t(8;21)(q22;q22) without *RUNX1T1* by cytogenetic technique and molecular biology Q-PCR, 3'RACE PCR and sequencing

THÈSE : MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2014

MOTS CLEFS : Leucémie aiguë myéloïde, t-LAM, translocation, *RUNX1*, lncARN, 3'RACE PCR

INTITULÉ ET ADRESSE :

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
