



HAL
open science

Mise en évidence de régions minimales critiques par
CGH array haute résolution de leucémies aiguës
myéloblastiques induites par les traitements
anti-néoplasiques (t-LAM) et de leucémies aiguës
myéloblastiques de novo (p-LAM)

Nathalie Itzhar Baïkian

► To cite this version:

Nathalie Itzhar Baïkian. Mise en évidence de régions minimales critiques par CGH array haute résolution de leucémies aiguës myéloblastiques induites par les traitements anti-néoplasiques (t-LAM) et de leucémies aiguës myéloblastiques de novo (p-LAM). Génétique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66212 . tel-00831321

HAL Id: tel-00831321

<https://theses.hal.science/tel-00831321>

Submitted on 6 Jun 2013

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

SCIENCES DE LA VIE

Présentée par

Mme ITZHAR-BAÏKIAN Nathalie

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**MISE EN EVIDENCE DE REGIONS MINIMALES CRITIQUES PAR CGH ARRAY
HAUTE RESOLUTION DE LEUCEMIES AIGUES MYELOBLASTIQUES
INDUITES PAR LES TRAITEMENTS ANTI-NEOPLASIQUES (t-LAM) ET DE
LEUCEMIES AIGUES MYELOBLASTIQUES *DE NOVO* (p-LAM)**

Soutenue le **5 juillet 2012**

devant le jury composé de :

M. le Professeur Jean Pierre MARIE – Président
M. le Professeur Jean SOULIER - Rapporteur
M. le Docteur Marc Henri STERN - Rapporteur
M. le Docteur Franck VIGUIE - Examineur
M. le Docteur Alain BERNHEIM - Directeur de thèse

Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données

Esc G, 2^{ème} étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35

Fax : 01 42 34 68 40
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 42 34 69 54
Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 42 34 68 41
Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 42 34 68 51

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6 E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Je tiens à remercier infiniment M. le Professeur Jean Pierre MARIE de m'avoir fait l'honneur d'être le Président de cette thèse.

Je remercie également M. le Professeur Jean SOULIER et M. le Professeur Marc Henri STERN d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et d'avoir consacré le temps nécessaire pour cette tâche.

Je remercie surtout le Docteur Alain BERNHEIM qui a toujours été présent et disponible tout au long de ce travail fort intéressant en me réservant beaucoup de temps et de gentillesse et de patience lors de mes nombreux jours intensifs de présence sur le site de l'IGR. Merci pour toutes ces discussions fort riches et la transmission d'un certain savoir dans mon esprit de formation clinique.

Je remercie Mme le Professeur Muriel UMBHAUER de l'Ecole Doctorale "Complexité du Vivant" pour la confiance en mon travail et sa compréhension pour deux inscriptions successives supplémentaires.

Je remercie le Docteur Stéphane de BOTTON qui a permis à ce projet de s'enrichir en nombre de cas et de perdurer dans le temps (également sur un plan financier!).

Je remercie le Docteur Nathalie AUGER pour m'avoir donné les "filons" des nouveaux cas intéressants pour mon projet et l'interaction personnelle que l'on a toutes les deux.

Je tiens aussi à remercier MM. Philippe DESSEN et Bastien JOB pour leur performance, leur implication et leur gentillesse dans ce travail. La bioinformatique est si lourde à porter!

Je remercie Mme Catherine RICHON pour sa gentillesse, sa disponibilité et son savoir faire pour des étapes critiques techniques de ce travail.

Je tiens à offrir une spéciale dédicace à l'ensemble des techniciens de cytogénétique, Bernard CLAUSSE, Didier FAUVET, Caroline, Henintsoa, merci pour cette bonne humeur et votre soutien.

Ce travail n'aurait pas avancé aussi bien sans l'apport financier des taxes d'apprentissage successives que l'on a pu m'accorder.

Je remercie ma chef de service d'Hématologie biologique de l'Hôpital Antoine Bécclère, le Professeur Agnès VEYRADIER qui m'a permise d'aménager mon temps de travail du mieux possible.

Je remercie amoureusement mon mari, Bertrand, qui m'a apporté un soutien infaillible même quand mon endurance pour ce travail semblait moins soutenue. Merci mon cher sparing partner!

Je remercie mon petit garçon, Jonathan, qui a parfaitement compris que le mot "thèse" avait son importance lorsque je m'escrimais sur mon ordinateur et ma bibliographie étalée dans toute la maison. Merci mon Poussin.

Au petit bébé Samuel : merci d'être venu au monde !

Je remercie mes parents et ma soeur pour le souci porté à mes avancées avec leur inénarrable

“et ta thèse, cela avance?”!

Je remercie également mes beaux-parents pour leurs encouragements appuyés. De plus, le 5 juillet n'est il pas une date d'anniversaire très touchante ?

Et puis, même s'ils ne sont plus, je pense toujours à mes deux grand-mères et deux grands-pères que je porte intensément dans mon cœur.

Enfin je remercie les patients. Leur maladie est une étape difficile dans leur vie et celle de leur famille et j'espère que ce projet permettra de continuer d'autres avancées thérapeutiques. Je souhaite, comme d'autres équipes de chercheurs, que la survie des patients soit encore meilleure.

RESUME

Les traitements antinéoplasiques (chimiothérapie et radiothérapie) peuvent induire des conséquences graves telles que des leucémies aiguës myéloblastiques (t-LAM). Ces t-LAM, le plus souvent de mauvais pronostic, présentent des anomalies cytogénétiques récurrentes et spécifiques de l'agent mutagène. Des monosomies des chromosomes 5 et 7 ou des délétions du bras long de ces mêmes chromosomes se rencontrent après expositions aux agents alkylants (AA), tandis que des translocations équilibrées impliquant fréquemment la région 11q23.3, se voient après l'administration d'anti topoisomérases II (ATII). Ces anomalies acquises sont aussi retrouvées dans les leucémies aiguës myéloblastiques *de novo* (p-LAM) laissant suggérer que des mécanismes de leucémogénèse soient identiques entre ces 2 groupes de leucémie.

L'utilisation de puces ADN à haute résolution (de 244 K ou 2x400 K oligonucléotides) par la technique Array Comparative Genomique Hybridization (aCGH), permet de mettre en évidence, sur l'ensemble du génome, des anomalies cryptiques jusqu'à des tailles de quelques dizaines de kilobases. Les ADN leucémiques de 36 patients présentant une t-LAM et de 49 atteints d'une p-LAM ont été étudiés avec cet outil performant. Cette étude a pu révéler des pertes ou des gains de matériel (hormis les échanges équilibrés) ou CNA (Copy Number Abnormalities Anomalies du nombre de Copie).

A partir de la recherche des CNA au sein des t-LAM et des p-LAM, le but de ce travail a été de définir des régions minimales critiques (RMC) pouvant contenir des gènes candidats à la leucémogénèse induites et/ou primitive. L'ensemble de ces résultats a été intégré et comparé à des données déjà publiées ces 5 dernières années. Les RMC situées en 5q et en 7q demeurent encore trop grandes pour définir aisément des gènes candidats. Cependant des gènes candidats dans d'autres régions, de plus petite taille, tels que *RUNX1*, *NF1*, *ETS2* ou *TET2* sont mis en évidence avec des fréquences différentes entre les t-LAM et les p-LAM.

Ainsi, il ressort qu'il est possible de proposer de classer les anomalies génomiques acquises des LAM en 3 catégories différentes : i) les anomalies communes aux t-LAM et aux p-LAM, ii) les anomalies essentiellement retrouvées dans les t-LAM, iii) les anomalies essentiellement retrouvées dans les p-LAM.

L'étude du transcriptome et du miRNome a été la seconde étape de ce travail. Elle a porté sur un petit nombre de patients étudiés en CGH array. Les résultats préliminaires présentent une difficulté d'interprétation lorsqu'ils sont comparés aux données génomiques de ces patients.

MOTS CLEFS : t-LAM ; LAM *de novo* ; cytogénétique ; anomalies chromosomiques ; CGH array haute résolution ; CNA ; gènes candidats.

DISTINCTION OF MINIMAL CRITICAL REGIONS, SOME SPECIFIC OF t-AML, BY HIGH RESOLUTION CGH ARRAY OF THERAPY RELATED ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA (t-AML) AND DE NOVO ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA (p-AML).

The antineoplastic treatments (chemotherapy and radiotherapy) can have severe consequences such as acute myeloblastic leukaemia (t-AML). These t-AML, mostly of poor prognosis, present recurrent cytogenetic abnormalities which are specific of the mutagenic agent. Monosomies of chromosomes 5 and 7 or deletions of the long arm of these same chromosomes are observed after exposures to alkylants agents (AA), whereas balanced translocations involving frequently the 11q23.3 region, are seen after the administration of topoisomerase II inhibitors (ATII). These acquired abnormalities are also found in *de novo* acute myeloblastic leukemia (p-LAM) suggesting that the mechanisms of leukemogenesis are identical between these 2 groups of leukemia.

The use of high-resolution DNA microarrays (244 K or 2x400 K oligonucleotides) or Comparative Genomique Hybridization array (aCGH) allows to identify cryptic abnormalities as low as 30 kilobases, scattered through the whole genome. The leukemic DNA from 36 patients presenting a t-AML and from 49 affected by a p-AML are studied with this performant tool. This study was able to reveal losses or gains of genetic material (except the balanced exchanges) or CNA (Copy Number Abnormalities).

Thus, the purpose of this work is to look for CNA in the bosoms of t-LAM and p-LAM. Some of these CNA were grouped together in minimal critical region (MCR) which can contain candidate genes in the induced and/or primitive leukemogenesis. All these results were integrated and compared with data already published these last 5 years. The MCR located in 5q and 7q remains still too large to define easily candidate genes. However candidate genes in other regions such as *RUNX1*, *NF1*, *ETS2* or *TET2* are brought to light with different frequencies between t-AML and p-AML.

So, it emerges that it is possible to suggest classifying AML acquired genomic abnormalities in 3 different categories : i) the abnormalities common to t-AML and to p-AML, ii) the abnormalities rather found in t-AML, iii) the abnormalities rather found in p-AML.

The study of the transcriptome and the miRNome is the second stage of this work. It concerned a small number of patients studied in CGH array. The interpretation of the preliminary results is difficult when they are compared with the genomic data of these patients.

KEY WORDS: t-AML; *de novo* AML; cytogenetic; chromosomal abnormalities; high resolution CGH array; CNA; candidate genes.

La thèse s'est déroulée à l'unité INSERM U985, au laboratoire de cytogénétique de la plateforme des laboratoires de l'Institut Gustave Roussy et à l'Unité de Génomique Fonctionnelle de l'Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION -----	15
I.HISTORIQUE -----	15
I.1.Les irradiations-----	15
I.2.Le benzène et autres produits chimiques -----	16
I.3.Les chimiothérapies -----	17
II.CYCLE CELLULAIRE ET POINTS DE CONTROLE -----	18
II.1.Régulation moléculaire du cycle cellulaire-----	18
II.1.1.Les protéines kinases dépendantes des cyclines Cdk (cyclin dependent protein kinases)-----	18
II.1.2.Les inhibiteurs physiologiques des Cdk (CKI : cyclin dependent kinase inhibitors)-----	18
II.1.3.Le point de restriction-----	21
II.2.Régulation moléculaire des points de surveillance du cycle cellulaire -----	22
II.2.1.Les kinases dépendantes des phosphatidyl inositols (PI3K-related kinases) -----	22
II.2.2.Les protéines kinases Chk1 et Chk2-----	22
II.2.3.Cdc25A et la voie p53-p21 dans le point de surveillance G1-S -----	23
II.2.4.Cdc25C et p53 dans le point de surveillance G2-M-----	23
III.LES PRINCIPAUX MECANISMES DE REPARATION DE L'ADN	
III.1. Le système Base Excision Repair (BER)-----	24
III.2. Le système Nucleotide Excision Repair (NER) -----	24
III.3. Le système Mismatch Repair (MMR) -----	25
III.4. Recombinaisons de l'ADN -----	25
III.5. La réversion directe-----	26
IV.MECANISMES FONDAMENTAUX DE L'ONCOGENESE -----	26
IV.1.Généralités -----	26
IV.1.1.Nature des oncogènes-----	26
IV.1.2.Nature des gènes suppresseurs de tumeur-----	27
IV.1.3.Gènes suppresseurs de tumeur et prédispositions aux cancers -----	28

IV.2.Principes des mécanismes d'action d'agents anti-cancéreux potentiellement leucémogènes-----	28
IV.2.1.Les agents alkylants (AA) -----	28
IV.2.1.1.Les AA monofonctionnels -----	29
IV.2.1.1.1.Mécanismes d'action-----	29
IV.2.1.1.2.Mécanismes de réparation de l'ADN utilisés par la cellule -----	29
IV.2.1.2.Les AA bifonctionnels -----	30
IV.2.1.2.1.Mécanismes d'action-----	30
IV.2.1.2.2.Mécanismes de réparation de l'ADN utilisés par la cellule-----	30
IV.2.2.Les antitopoisomérases II (ATII)-----	30
IV.2.2.1. Mécanismes d'action-----	30
IV.2.2.1.1.Le point de cassure 11q23 post étoposide -----	31
IV.2.2.1.2.La translocation t(15;17) -----	31
IV.2.2.1.3.La translocation t(9;22)-----	31
IV.2.2.2.Mécanismes de réparation de l'ADN utilisés par la cellule-----	32
IV.2.3.La radiothérapie-----	32
IV.2.4.En résumé-----	35
IV.2.4.1. Relation entre chimiothérapie avec agents alkylants, mécanismes de réparation de l'ADN et les t-LAM-----	35
IV.2.4.2. Relation entre chimiothérapie avec antitopoisomérase II, mécanismes de réparation de l'ADN et les t-LAM -----	35

V.ANOMALIES CYTOGENETIQUES ET GENETIQUES RECURRENTES - 36

V.1.Anomalies cytogénétiques dans les t-LAM-----	38
V.2.Anomalies moléculaires – les mutations -----	44
V.2.1.Mutations du gène <i>NPM1</i> -----	44
V.2.2.Mutations du gène <i>FLT3</i> -----	46
V.2.3.Mutations du gène <i>CEBPA</i> -----	46
V.2.4.Mutations en Partial Tandem Duplication PTD du gène <i>MLL</i> -----	46
V.2.5.Mutations du gène <i>NRAS</i> -----	46
V.2.6.Mutations du gène <i>WT1</i> -----	47
V.2.7.Mutations des gènes <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> -----	47

V.2.8.Mutations des gènes <i>RUNX1</i> et <i>TET2</i> -----	47
V.2.9.Comparaison entre les t-LAM et les LAM du sujet âgé-----	47
VI.SUSCEPTIBILITE CONSTITUTIONNELLE AUX t-LAM -----	48
VI.1.Polymorphisme des gènes de réparation de l'ADN-----	48
VI.1.1.Dans le système RH (Recombinaison Homologue)-----	48
VI.1.2.Dans le système BER (Base Excision Repair) -----	49
VI.1.3.Dans le système NER (Nucleotide Excision Repair)-----	49
VI.1.4.Dans le système MMR (MisMatch Repair)-----	49
VI.2.Polymorphisme des gènes de détoxification-----	49
VI.2.1.Cytochrome p450 (CYP)-----	50
VI.2.2.Conjugaison (phase II)-----	50
VII.PRINCIPES DE LA CGH array -----	53
VIII.OBJECTIFS DU PRESENT TRAVAIL -----	56
<i>MATERIELS ET METHODE</i> -----	57
I.POUR L'ETUDE EN aCGH 244K ET 2x400K -----	57
I.1.Patients atteints d'une t-LAM-----	57
I.2.Patients atteints d'une p-LAM-----	57
I.3.Description des étapes depuis la décongélation jusqu'à l'utilisation des puces Agilent® -----	57
I.4.Culture des fibroblastes -----	66
I.5.Scanning et bio informatique-----	66
II.POUR L'ETUDE DU TRANSCRIPTOME ET DU miRNOME -----	67
III.1.Patients étudiés-----	67
III.2.Extraction des ARN totaux et bio informatique -----	67
<i>RESULTATS</i> -----	68
I.CULTURE DES FIBROBLASTES MEDULLAIRES -----	68

II.CYTOGENETIQUE	68
III.COPY NUMBER VARIATIONS : CNV	68
IV.CAS PARTICULIER DES CNV ACQUIS	71
V.CORRELATION CARYOTYPES ET ANOMALIES ACQUISES EN aCGH HAUTE RESOLUTION	71
VI.COPY NUMBER ABNORMAQLITIES : CNA	73
VII.RESULTATS DES PATIENTS t-LAM PAR aCGH 244K	76
VIII.RESULTATS DES PATIENTS t-LAM PAR aCGH 2x400K	76
IX.RESULTATS DES PATIENTS p-LAM PAR aCGH 244K	76
X.RESULTATS DES PATIENTS p-LAM PAR aCGH 2x400K	76
XI.LES REGIONS MINIMALES CRITIQUES	78
XII.CNA ISOLEES	78
XIII.TRANSCRIPTOME	84
XII.1.Les gènes les plus surexprimés	84
XII.2.Les gènes les plus sous exprimés	84
XII.3.Comparaison des résultats du transcriptome avec les gènes candidats des RMC	84
XIV.ETUDE DES miRNA	89
<i>DICUSSION</i>	91

I.ECHEC DE LA CULTURE DES FIBROBLASTES MEDULLAIRES -----	91
II.UTILISATION DE L'aCGH ARRAY 244K ET DE L'aCGH ARRAY	
2x400K -----	91
III.LES COPY NUMBER VARATIONS (CNV) -----	91
III.1.Les CNV constitutionnels-----	91
III.2.Les CNV acquis-----	92
IV.LES COPY NUMBER ABNORMALITIES (CNA) -----	92
V.LES REGIONS MINIMALES CRITIQUES -----	93
V.1.RMC -1q-----	94
V.2.Deux RMC -3p-----	94
V.3.RMC -4q-----	95
V.4.Des RMC -5q-----	95
V.5.RMC du chromosome 7-----	96
V.5.1.Région -7p-----	96
V.5.2.Région +7p-----	97
V.5.3Région -7q-----	98
V.6.RMC +8q24.3-----	99
V.7.RMC +11q24.2q24.3-----	99
V.8.RMC -12p13-----	102
V.9.RMC -17p13.2p13.1-----	103
V.10.RMC -17q11.2-----	104
V.11.RMC en 21q22-----	106
V.11.1.RMC -21q22.12 : <i>RUNX1</i> -----	106
V.11.2.RMC +21q22 : <i>ERG</i> et <i>ETS2</i> -----	111
VI.TRANSCRIPTOME ET miRNOME -----	121
VI.1.Etude préliminaire du transcriptome-----	121
VI.2.Etude préliminaire du miRNome-----	123
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES -----	124
BIBLIOGRAPHIE -----	128

ANNEXES -----	150
Tableau 11 Gains et pertes de CNA des t-LAM et leur caryotype révisé après étude en aCGH 244K-----	151
Tableau 12 Gains et pertes de CNA des t-LAM et leur caryotype révisé après aCGH 2x400K -----	154
Tableau 13 Gains et pertes de CNA des p-LAM et leur caryotype révisé après aCGH 244K -----	155
Tableau 14 Gains et pertes de CNA des p-LAM et leur caryotype révisé après aCGH 2x400K-----	158
Tableau de l'article de Wong <i>et al.</i> - Quelques exemples de CNV associés aux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur et cancers-----	160
Figure 7 Variation _111829 contenant les gènes de la famille HOXA-----	161
Publications personnelles -----	162

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Schéma du cycle cellulaire : interaction Cyclines/Cdk/Activateurs et inhibiteurs--	20
Figure 2 Huit voies génétiques alternatives dans les t-LAM proposées par Pedersen-Bjergaard <i>et al.</i> -----	45
Figure 3 Mécanismes possibles de susceptibilité aux t-LAM-----	52
Figure 4 Principes de la CGH array -----	55
Figure 5A Profil du patient t-21 présentant une t(9;11) -----	72
Figure 5B Profil en aCGH 244K d'une t-LAM à caryotype complexe (patient t-4)-----	74
Figure 5C Profil en aCGH 244K du patient t-13 -----	75
Figure 6 Amplification de la région 11q du patient t-PIO-----	77
Figure 8 Modèle de la boucle de rétrocontrôle négatif de Fli-1 et de SHIP-1 -----	101

Figure 9 Voie de signalisation de Ras (version partielle) où figure la perte de NF1, consécutive de l'activation de Ras, augmentant la survie des cellules blastiques myéloïdes-----	105
Figure 10 Les différents types de mutations de <i>RUNX1</i> -----	108
Figure 11 Deux voies moléculaires des SMD/LAM selon 2 types de mutants de <i>RUNX1</i> --	109
Figure 12 Les mutations de <i>RUNX1</i> et leur présence dans différentes néoplasies myéloïdes-----	110
Tableau 1 Résumé des anomalies cytogénétiques dans les t-LAM en fonction de l'agent mutagène -----	17
Tableau 2 Classification des agents de chimiothérapie par leur mécanisme d'action -----	34
Tableau A Types d'anomalies chromosomiques en oncologie -----	37
Tableau B Anomalies chromosomiques sélectionnées par le processus malin-----	40
Tableau 3 Mode de présentation des t-LAM-----	42
Tableau 4 Résultats cytogénétiques des 306 t-LAM étudiées par Larson <i>et al</i> -----	42
Tableau 5 Répartition en 2 groupes des t-LAM selon Larson et Le Beau-----	44
Tableau C Similitudes, en comparaison avec les p-LAM, entre les t-LAM et les LAM du sujet âgé-----	48
Tableau 6 Patients présentant une t-LAM, étudiés par aCGH 244K: aspects clinique, biologique et cytogénétique -----	58
Tableau 7 Patients présentant une t-LAM pour l'analyse par aCGH 2x400K : aspects clinique, biologique et cytogénétique -----	62
Tableau 8 Patients présentant une p-LAM pour l'analyse par aCGH 244K : aspects clinique, biologique et cytogénétique -----	63
Tableau 9 Patients présentant une p-LAM pour l'analyse par aCGH 2x400K : aspects clinique, biologique et cytogénétique -----	65
Tableau 10A tableau (non exhaustif) des CNVs constitutionnels le plus souvent retrouvés-	70
Tableau 10B CNV acquis-----	70

Tableau 15 Régions minimales critiques dans le groupe des t-LAM (aCGH 244K et 2x400K confondues) -----	79
Tableau 16 Régions minimales critiques dans le groupe des p-LAM (aCGH 244K et 2x400K confondues)-----	80
Tableau 17 CNA isolées des patients t-LAM par aCGH 244K-----	81
Tableau 18 CNA isolées des patients p-LAM par aCGH 244K-----	81
Tableau 19 CNA isolées des patients t-LAM par aCGH 2x400K-----	82
Tableau 20 CNA isolées des patients p-LAM par aCGH 2x400K-----	83
Tableau 21 Expression des gènes candidats des RMC perdues et leur expression dans 5 t-LAM de la série étudiée par aCGH 244 K-----	85
Tableau 22 Expression des gènes candidats des RMC perdues et leur expression dans 7 p-LAM de la série étudiée par aCGH 244 K-----	86
Tableau 23 Expression des gènes candidats des RMC gagnées dans 5 t-LAM de la série étudiée par aCGH 244 K -----	87
Tableau 24 Expression des gènes candidats des RMC gagnées dans 7 p-LAM de la série étudiée par aCGH 244 K -----	88
Tableau 25 miRNA exprimés dans les p-LAM et les t-LAM -----	90
Tableau 26A Pertes reportées dans la littérature toutes techniques d'arrays confondues et du présent travail selon l'hg18-----	113
Tableau 26B Gains reportés dans la littérature toutes techniques d'arrays confondues et du présent travail selon l'hg18 -----	119
Tableau 27 Tableau de synthèse des gènes candidats dans les t-LAM et les p-LAM-----	127

INTRODUCTION

Les leucémies secondaires induites, ou t-LAM (therapy related leukemia, t-AML) et les myélodysplasies secondaires induites, ou t-SMD (therapy related myelodysplastic syndrome, t-SMD) sont des complications graves des traitements anti néoplasiques. Elles sont connues depuis longtemps. C'est également ainsi que la classification OMS de 2008 le conçoit en les regroupant comme une entité à part sous le terme : *Therapy-related myeloid neoplasms*. Pour plus de simplicité, sous le terme t-LAM sont regroupés les t-SMD et les t-LAM car comme on le verra plus loin, certaines t-LAM sont précédées d'une phase pré-leucémique myélodysplasique. Les t-LAM représentent, selon la littérature, entre 10 et 30 % des leucémies [Leone G, 2007 ; Schoch C, 2004].

Elles semblent de plus en plus fréquentes. Les raisons de cette augmentation de fréquence sont notamment des dépistages des cancers plus systématiques et un nombre de lignes thérapeutiques plus important contribuant à l'augmentation de la survie de ces patients [Kayser S, 2011]. Les risques de t-LAM ont été discutés après la seconde guerre mondiale par l'usage possible du Phosphore 32 dans le traitement des polyglobulies de Vaquez [Dameshek W, 1946].

Cette pathologie représente l'opportunité de s'intéresser aux effets mutagènes impliqués dans l'oncogénèse des cellules progénitrices hématopoïétiques humaines

La découverte de mécanismes leucémogènes dans ces leucémies peuvent donner des explications dans l'apparition des LAM *de novo* que l'on dénommera, dans cette thèse, p-LAM, « p » pour primaire. Aussi, il ne sera traité essentiellement dans ce travail que de l'aspect induit de la leucémogénèse.

Avant d'aller plus avant dans l'introduction, les premiers paragraphes qui vont suivre s'attacheront dans un premier temps à parcourir brièvement un historique sur la notion de cancers induits. Les suivants concerneront le cycle cellulaire, les agents thérapeutiques employés pour traiter les néoplasies primitives, les mécanismes de réparation de l'ADN et enfin les anomalies cytogénétiques et génétiques connues jusqu'à cette première décennie du XIX^{ème} siècle des leucémies myéloblastiques.

I. HISTORIQUE

I.1. Les irradiations

La découverte en 1895 des rayons X est due aux travaux de Röntgen à l'Université de Würzburg. La première radiophotographie de la main de son épouse est effectuée lors de la conférence à la Société Physico Médicale de Würzburg en décembre 1895. Un an plus tard l'américain Daniel décrit une grave réaction cutanée survenue après une longue exposition aux rayons X. Plusieurs événements, qui ne sont pas ici détaillés, se sont déroulés au fur et à mesure du temps. On peut revenir sur la description en 1898 par Rollins de ses cobayes irradiés et rapidement morts après leur irradiation. La même année, Pierre et Marie Curie annoncent la découverte du radium. Deux ans plus tard, leur collaborateur, Becquerel, en gardant une fiole de radium dans sa poche, a remarqué un érythème cutané en regard de la position de sa poche ; Pierre Curie a ensuite exposé son bras aux irradiations pendant 10 heures provoquant une lésion cutanée qui a guéri au bout de 4 mois. Par ailleurs, Walkoff a signalé les premières atteintes de la peau des doigts des praticiens et physiciens qui manipulent le radium.

En 1902, Friebens et Albers-Schoenberg ont signalé à la Société Médicale de Hambourg le premier cas de cancer apparu sur une radiodermite professionnelle. Le patient travaillait depuis 4 ans dans une fabrique d'ampoules de rayons X et se servait de sa main pour effectuer les mises au point ; il a présenté une radiodermite chronique transformée en cancer, la seule issue thérapeutique en a été la désarticulation de l'épaule car l'amputation du bras était insuffisante. En 1906, Bergonié et Tribondeau ont établi une loi qui stipule que « les cellules sont d'autant plus sensibles aux radiolésions que (i) leur activité de renouvellement est grande comme les cellules de la membrane basale, (ii) leur morphologie et leur fonction sont moins définitives comme les cellules de l'embryon et (iii) leur capacité de division est conservée plus longtemps ». Ensuite, toute la première partie du XXème siècle voit de nombreux cas de cancers rapportés chez les radiologues, les chirurgiens (pour rechercher les éclats de métaux chez les blessés de guerre), les vétérinaires, les dentistes, tous manipulant de la radioactivité. C'est ainsi que les modalités de radioprotection se sont précisées et ont évolué.

Les rayons X deviennent également une thérapeutique. Mais c'est en 1960 que Silberberg et al. [Silberberg DH, 1960] a rapporté une série de 496 cas de patients présentant une spondylarthrite ankylosante traités par radiothérapie à visée antalgique. Cinq patients ont développé une t-LAM. Des équipes japonaises et américaines ont suivi les victimes des bombes atomiques de Hiroshima et de Nagasaki. Les premiers articles concernant ces patients sont parus dans les années 50. [Folley JH, 1952; Wald N, 1958; Lange RD, 1954]. Les temps de latence entre l'exposition et l'apparition de la t-LAM varient entre 2 et 15 ans.

Les anomalies chromosomiques induites par les radiations sont décrites dès les débuts de la cytogénétique. Il s'agit d'anomalies non systématisées, différentes d'une cellule à l'autre. Ce sont des cassures chromosomiques, des figures d'échange [Savage JRK, 1999]. Les cassures augmentent de façon linéaire avec la dose d'irradiation, ce qui donne une base à la dosimétrie cytogénétique.

Rowley décrivait au début des années 80 [Rowley JD, 1981] une fréquence accrue d'anomalies cytogénétiques systématisées touchant les chromosomes 5 et 7 (monosomie ou délétion du bras long de ces chromosomes). D'ailleurs des travaux sur des modèles animaux comme celui de Hayata et son équipe, en 1979 [Hayata I, 1979] ont montré que des anomalies chromosomiques récurrentes sont visibles chez des souris présentant des leucémies myéloblastiques radio-induites et notamment le chromosome 2.

Plus récemment, un cas de t-LAM avec monosomie 7 chez un sujet de 60 ans a été rapporté [Takahashi T, 2006] laissant suggérer que les temps de latence peuvent être très long (55 ans). Des anomalies chromosomiques non systématisées peuvent persister des décades avec des effets directs et indirects [Savage JRK 1999, Little JB, 2003]. Des facteurs tels que l'âge et la durée d'exposition aux rayons, et les doses reçues étaient déjà décrits dans les années cinquante [Lewis EB, 1957].

I.2. Le benzène et autres produits chimiques

Vers la fin du XVIIIe siècle, Pott a constaté qu'il existait une forte incidence, parmi les très jeunes ramoneurs, de cancers du scrotum. Ces patients étaient en contact étroit avec la suie des cheminées. Pott a alors suggéré qu'il existerait dans la suie des carcinogènes. Un siècle et demi plus tard, on comprendrait que la suie contient des goudrons au pouvoir carcinogène. Ce fut les premiers mutagènes ainsi mis en évidence.

Le benzène a historiquement été suspecté comme un agent toxique de la moelle osseuse à partir de la fin du XIXe début du XXe siècle. [Bird MG, 2010]. Les cas décrits concernaient des

patients travaillant dans l'industrie utilisant le pétrole comme matière première (notamment la fabrication des pneus).

Les travaux de Golomb en 1982 [Golomb HM, 1982] montrent qu'il existe une relation entre des anomalies chromosomiques touchant les chromosomes 5 et 7 de LAM *de novo* et les patients exposés à des pesticides, des produits chimiques, solvants ou dérivés du pétrole. Ces anomalies sont bien plus représentées parmi cette population exposée que celle non exposée à ces produits.

I.3. Les chimiothérapies

De nombreux articles à la fin des années 70, ont eu pour sujet les leucémies induites chez des patients traités pour des lymphomes de Hodgkin. Pendant de longues années ces patients étaient très lourdement traités et cette grave complication avait une forte incidence dans cette population. Il apparaissait clairement que des anomalies cytogénétiques étaient récurrentes dans ce contexte. Rowley et al [Rowley JD, 1981] a montré qu'il existait une corrélation entre les traitements reçus et les anomalies cytogénétiques, notamment que l'association chimiothérapie et radiothérapie amenait plus souvent des délétions partielles ou totales des chromosomes 5 et 7.

Ce n'est seulement qu'au début des années 90 que l'on met en évidence un point de cassure au sein de translocations équilibrées en 11q23 impliquant le gène *MLL*. Celui-ci est réarrangé dans les leucémies et génère un impact pronostic péjoratif [Mitelman F, 1990 ; Altman AJ, 1990].

Plusieurs équipes s'aperçoivent qu'il existe une corrélation entre l'administration d'ATII et la fréquence des t-LAM avec un remaniement en 11q23 [Ratain MJ, 1992 ; Pedersen-Bjergaard J, 1991 ; Super HJ, 1993]

En 1991 Pedersen-Bjergaard et Philip [Pedersen-Bjergaard J, 1991] résument les anomalies cytogénétiques acquises des leucémies induites et précisent qu'elles sont spécifiques de l'agent mutagène. Ce qu'ils ont rapporté est dans le tableau 1 issu de cet article. Il faut relever que le titre de leur article soulève la question de deux entités différentes entre t-LAM et LAM *de novo*.

Tableau 1 – Résumé des anomalies cytogénétiques dans les t-LAM en fonction de l'agent mutagène

Types d'anomalies	Caractéristiques
Translocations équilibrées t(9;11)(p21;23) t(11;_)(q23;_) t(8;21)(q22;q22) t(15;17)(q22;q11) inv(16)(p13q22)	Patients jeunes Rarement ou jamais de phase myélodysplasique En relation avec la classification FAB Réponse favorable à la chimiothérapie Caused par les agents cibles des ATII Caused par les agents cibles des ATII
Anomalies déséquilibrées -7 -5 5q- 7q-	Patients plus âgés Souvent précédées d'une myélodysplasie Sans relation avec la classification FAB Mauvaise réponse aux traitements Liées à l'exposition aux toxiques causés par les AA

Il faut noter que cet article ne reportait pas l'anomalie plusieurs fois publiée, de la délétion en 12p13 [Block AW, 2002 ; Pedersen-Bjergaard J, 1987].

II. CYCLE CELLULAIRE ET POINTS DE CONTROLE

II.1. Régulation moléculaire du cycle cellulaire

Un des mécanismes fondamentaux de la cancérogenèse est la prolifération incontrôlée des cellules tumorales. Des cellules normales se divisent peu et restent à l'état de quiescence en phase G0 du cycle cellulaire. L'entrée en cycle cellulaire passe par un point de non-retour ou point de restriction. Une fois franchi ce point, la cellule s'avance dans le cycle cellulaire selon 4 phases : G1 (précédant la synthèse d'ADN), S (synthèse de l'ADN), G2 (deuxième pause) et la phase M.

II.1.1. Les protéines kinases dépendantes des cyclines (Cdk :cyclin-dependent protein kinases) (figure 1)

L'action coordonnée de complexes protéiques constitués de cyclines et de Cdk, leurs partenaires, est nécessaire à la prolifération cellulaire. Les Cdk sont actives lorsqu'elles sont fixées aux cyclines.

Pour franchir le point de restriction, les complexes Cycline D-Cdk4-6 et Cycline E/A-Cdk2 sont activés et engagent la cellule à transiter de la phase G1 vers la phase S. Durant la synthèse de l'ADN, Cdk2 reste active dans son complexe avec la Cycline E ou la Cycline A.

Le complexe cycline B-Cdk1 est présent quant à lui lors de la transition de la phase G2 vers la phase M.

La régulation des Cdk est assurée par des phosphorylations et au contrôle des niveaux des cyclines dans le noyau.

La synthèse de la cycline D est induite par MYC et RAS notamment. La synthèse des Cyclines E/A est sous le contrôle positif des complexes transcriptionnels E2F.

L'activité kinase des Cdk est modulée par phosphorylation. Il s'agit de la phosphorylation d'une thréonine (dans la portion carboxy-terminale de la molécule) par deux kinases CAK (cyclin activated kinase ou complexe CycH-Cdk7) et c-TAK1. Pour Cdk1 c'est le résidu thréonine 161 qui est phosphorylé, pour Cdk2, c'est la thréonine 160 et pour Cdk4, c'est la thréonine 172.

L'inhibition des Cdk est assurée par la phosphorylation du site ATP dans la portion amino-terminale de la molécule (tyrosine 15 et thréonine 14) par 2 autres kinases : WEE1 et MYT1

A noter que l'inactivation de Cdk1 est empêchée par la phosphorylation de MYT1 par la kinase AKT.

Une autre voie d'activation des Cdk se fait par la déphosphorylation du résidu tyrosine 15 ou thréonine 14 par les phosphatases de la famille Cdc25 : Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C.

Cdc25A est nécessaire pour l'entrée en phase S et Cdc25B et Cdc25C sont impliquées dans l'entrée en mitose. Cdc25C est par ailleurs activée par le complexe Cycline B1-Cdk1 et la Polo kinase Plk1.

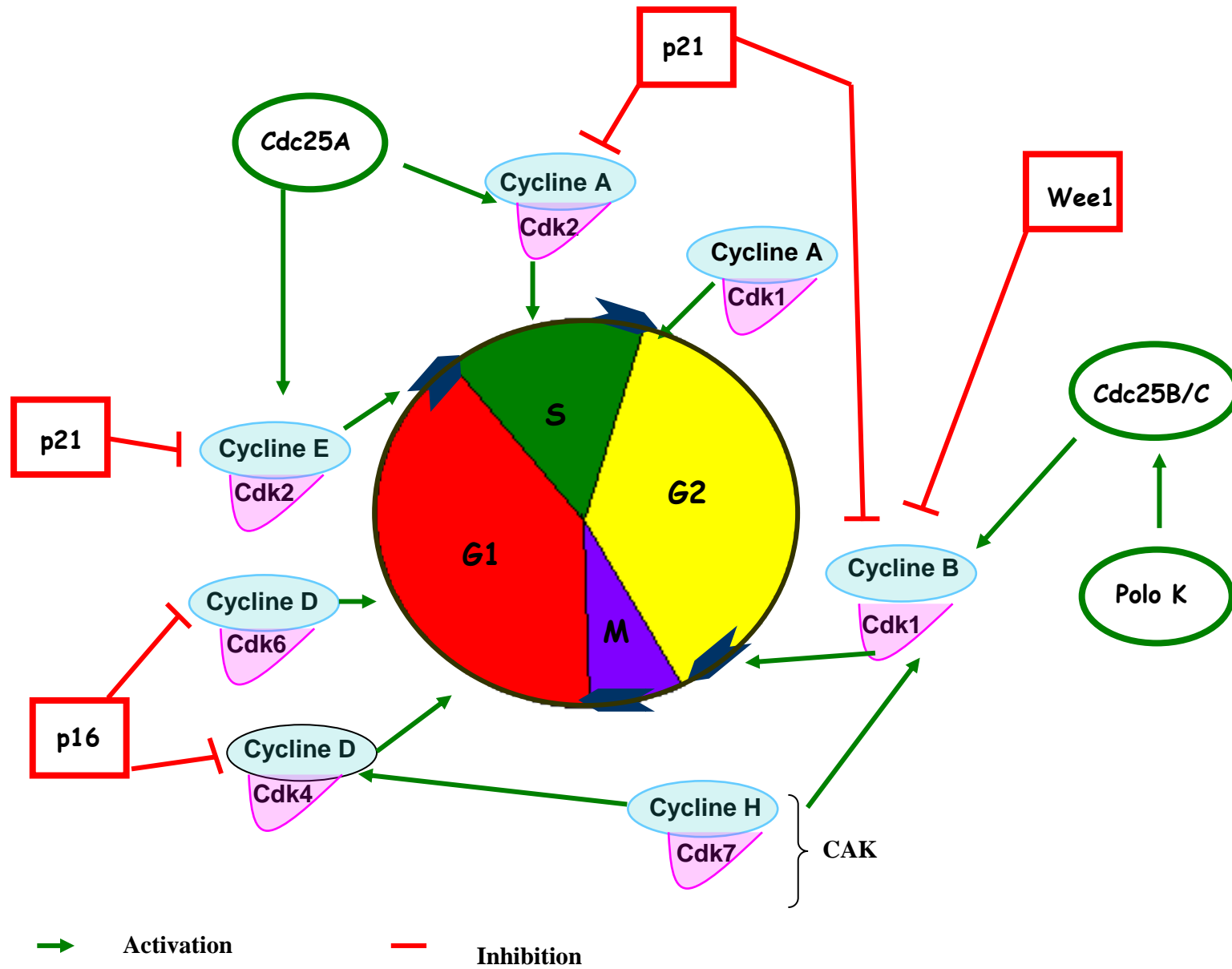
II.1.2. Les inhibiteurs physiologiques des Cdk (CKI :cyclin-dependent kinase inhibitors)

Les CKI appartiennent aux familles INK4 et Cip/Kip et contrôlent l'activité des complexes Cyclines-Cdk.

Les membres de la famille INK4 sont p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} et contiennent une répétition de motifs ankrine. Ils se lient spécifiquement aux kinases Cdk4 et Cdk6 qu'ils inhibent empêchant la liaison de la Cycline D

Les membres de la famille Cip/Kip sont p21^{Waf1/Cip1/Sid1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2} et se lient aux complexes Cyclines-Cdk en formant des hétérodimères. p27^{Kip1} est un gène suppresseur de tumeur empêchant la progression cellulaire en phase S en bloquant les complexes Cycline E-Cdk2 et Cycline A-Cdk2. La p21^{Waf1/Cip1/Sid1} inhibe les complexes Cycline E/A-Cdk2 et CyclineB-Cdk1. C'est l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à divers stress cellulaires : son promoteur est activé par la molécule p53.

Figure 1 - Schéma du cycle cellulaire : interaction Cyclines/Cdk/Activateurs et inhibiteurs



II.1.3. Le point de restriction

Le point de restriction est contrôlé par la voie pRb-E2F.

La famille E2F est composée de 6 membres qui sont activés par hétérodimérisation avec les protéines DP (DP1 et DP2).

Les gènes sous le contrôle des facteurs E2F sont multiples : gènes impliqués dans le cycle cellulaire, dans la réplication et la réparation de l'ADN. Parmi les gènes impliqués dans le cycle cellulaire on retrouve les cyclines A et E, Cdk2, Cdk1, Cdc25A, pRb et p107. E2F activent la transcription de gènes codant pour des protéines de la réplication tels que Orc1, Mcm, cdc6, Rfc2-4, PCNA, et des enzymes nécessaires à la synthèse de l'ADN (ADN polymérase α , thymidylate kinase, dihydrofolate réductase). Dans le groupe des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, E2F active ceux codant pour UDG, MutS, MutL, Rad51, DNA-PK, BCRA1. Enfin, E2F activent aussi p53 et Chk1, effecteurs des points de surveillance.

Les protéines de la famille pRb sont pRb, p130 et p107 et se fixent aux protéines E2F bloquant leur activité transcriptionnelle des cellules en G0 ou en début de G1. L'inhibition de la transcription est aussi liée aux déacétylases des histones (HDAC) recrutée par les protéines pRb. La chromatine est ainsi sous la forme condensée inaccessible aux facteurs transcriptionnels (E2F et DP). En G0, c'est p130 qui inhibe le complexe E2F-DP1 ; en phase G1, p130 est remplacée par pRb.

Pour assurer la transition de la phase G1 vers la phase S, Cycline D-Cdk4-6 phosphoryle pRb entraînant un blocage de l'interaction pRb- E2F et permettant à E2F d'activer l'expression des gènes codant pour les protéines essentielles à l'entrée en phase S et à la réplication de l'ADN. A l'inverse, les CKI maintiennent pRb dans son état répresseur hypophosphorylé, en bloquant l'activité des kinases Cdk4 ou Cdk6.

La terminaison de la phase S nécessite l'intervention de Cdk2 qui dissocie E2F de ses sites de liaison sur l'ADN.

Une autre voie impliquée dans la prolifération cellulaire est celle de l'oncogène *MYC*. La protéine Myc est labile et a pour partenaire une protéine stable Max. Le complexe Myc-Max active la transcription des cyclines D et ϵ et Cdc25A (phase de transition G0 vers G1). Myc active aussi la transcription des gènes codant pour Cdk4 et des facteurs E2F. Myc réprime la transcription de p21, gène suppresseur de tumeur. En revanche Myc est réprimé par TGF β qui par ailleurs induit l'expression de p15^{INK4b} et de p21^{Waf1/Cip1} ce qui entraîne l'arrêt de la prolifération cellulaire.

L'induction de l'expression de la Cycline E par E2F et Myc active ainsi Cdk2 entraînant la phosphorylation de pRb et p21^{Kip1}. La phosphorylation de pRb crée une boucle rétro-activatrice qui libère l'activité de E2F et contribue à l'irréversibilité de la transition de la phase G1 vers la phase S, ce qui définit le point de restriction.

Pendant les phases S et G2, Cdk1 et Cdk2 maintiennent la phosphorylation et l'inhibition de pRb jusqu'au moment où les cellules sortent de mitose.

II.2. Régulation moléculaire des points de surveillance du cycle cellulaire

Ces points de surveillance ou cell cycle checkpoints assurent le contrôle de qualité du cycle cellulaire et en particulier de la fidélité de la duplication du matériel génétique. En cas d'anomalies, ces mécanismes de surveillance arrêtent la progression du cycle cellulaire et activent les processus de réparation ou bien d'apoptose.

Synthétiquement, ce système de régulation est organisé en trois niveaux :

- des « détecteurs », sensibles aux anomalies de l'ADN, aux défauts du cytosquelette ou aux perturbations métaboliques,
- des « messagers », la plupart étant des protéines kinases et des molécules régulatrices fonctionnant comme des adaptateurs
- des « effecteurs », qui modifient directement les molécules impliquées dans le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN ou l'apoptose.

II.2.1 Les kinases dépendantes des phosphatidyl-inositols (PI3K-related kinases)

Elles assurent la coordination du cycle cellulaire avec le métabolisme de l'ADN et de la cellule. Trois de ces kinases sont directement activées en présence de cassures de l'ADN :

- la kinase ATM, ataxia telangiectasia mutated
- la kinase ATR, ataxia telangiectasia like and Rad3 homolog
- la kinase DNA-PK, DNA dependent protein kinase

Leur activation est impliquée dans l'arrêt du cycle permettant aux systèmes de réparation de fonctionner.

ATM est inactivée par mutation de son gène chez les patients atteints d'ataxie télangiectasie (maladie autosomique récessive) dont la caractéristique cellulaire est justement une déficience des points de surveillance du cycle cellulaire. Ainsi, en présence de cassures de l'ADN les cellules de ces patients sont incapables de s'arrêter en phase S ou en phase G2, continuent à proliférer et à synthétiser l'ADN, sans laisser le temps aux mécanismes de réparation de l'ADN d'agir pleinement. Il en résulte une hypersensibilité aux radiations ionisantes et aux agents mutagènes.

ATR est impliquée dans le signalement des anomalies au niveau des fourches de réplication de l'ADN de type cassures simple brin. La perte de fonction d'ATR est impliquée dans certains cancers.

DNA-PK est impliquée à la fois dans la surveillance du cycle cellulaire et dans les recombinaisons non homologues de l'ADN. Son activation est liée à l'apparition de cassures double brin de l'ADN.

Ces 3 kinases de surveillance du cycle cellulaire sont des régulateurs de protéines clef telles que p53, Mdm2, les kinases Chk1 et Chk2 et de différents détecteurs tels que NBS1, BCRA1, hRad9 et hRad17.

II.2.2. Les protéines kinases Chk1 et Chk2

Chk1 et Chk2 sont 2 sérine-thréonine kinases activées par ATM et ATR. Chk2 est exprimée indépendamment du cycle et de la prolifération cellulaire alors que l'expression de Chk1 suit le cycle cellulaire, son expression est maximale pendant les phases S et G2. Chk2 est principalement activée par ATM ; Chk1 l'est par ATR. Ainsi deux voies sont parallèles ATR-Chk1 et ATM-Chk2.

La voie ATR-Chk1 répond principalement aux blocages des fourches de réplication et aux lésions produites par les rayons ultraviolets. La voie ATM-Chk2 répond aux cassures double brin de l'ADN.

P53, Cdc25 et BCRA1 sont des substrats communs à Chk1 et Chk2 assurant ainsi une surveillance solide. Chk1 induit l'arrêt en G2 et Chk2 permet le maintien de cet arrêt.

II.2.3 Cdc25A et la voie p53-p21 dans le point de surveillance G1-S

Deux mécanismes ont une action sur le point de contrôle G1-S.

L'un est rapide et implique une cascade de kinases via ATM/ATR/Chk2 provoquant la dégradation de Cdc25A et inhibant les complexes Cycline D-Cdk4-6 et Cycline E/A-Cdk2.

Le deuxième processus est plus lent : activation de p53 et expression des gènes activés par p53. Normalement, p53 a une demi-vie très courte, elle est ainsi présente en faible quantité. Sous l'effet de diverses anomalies (lésions de l'ADN, hypoxie ou surexpression d'oncogène), la quantité de p53 augmente par l'intermédiaire de la phosphorylation du résidu sérine 15 par ATM et ATR et du résidu sérine 20 par Chk2, Chk1 et Plk3. Cette phosphorylation de p53 réduit sa fixation à Mdm2, ce qui diminue son ubiquitinylation et empêche ainsi sa dégradation dans le protéasome.

La stabilisation de p53 induit l'expression de p21^{Waf1/Cip1} qui s'accompagne de l'arrêt du cycle cellulaire.

p53 induit aussi l'expression de Mdm2 produisant ainsi un effet de rétrocontrôle négatif.

Lorsque p53 est déficiente, l'arrêt en G1 est atténué et la cellule entre en phase S malgré la présence de lésion de l'ADN.

La présence de p14^{ARF} provenant de *ARF*, inactive Mdm2 en induisant sa translocation vers le nucléole en inhibant son activité ubiquitine ligase et augmente l'acétylation de p53. Ainsi l'effet inhibiteur de Mdm2 sur l'acétylase p300/CBP est bloqué.

II.2.4 Cdc25C et p53 dans le point de surveillance G2-M

Il existe aussi un processus rapide et un processus lent.

Ce sont Chk1 et Chk2 qui interviennent dans le premier mécanisme en phosphorylant Cdc25C sur la sérine 216. Ceci permet à la protéine 14-3-3 σ de s'attacher à Cdc25C qui reste séquestrée dans le cytoplasme loin de Cdk1 localisée dans le noyau de la cellule.

Cdc25C peut être inactivée par la présence de lésions de l'ADN via une hyperphosphorylation du résidu tyrosine15 et par activation de Wee1.

III. ---LES PRINCIPAUX MECANIMES DE REPARATION DE L'ADN

Les traitements de chimiothérapies et de radiothérapie induisent des dommages de l'ADN. C'est ce qui est recherché lorsque ces traitements sont prescrits : pouvoir suffisamment altérer l'ADN des cellules malignes pour les conduire à la mort cellulaire sans trop altérer l'ensemble des tissus sains du patient.

Les principales lésions exogènes générées par ces traitements sont :

- la méthylation,
- le pontage intra brin ou inter brin de l'ADN
- la cassure simple brin
- la cassure double brin

La distribution systémique des chimiothérapies et les champs d'irradiation incluant les os plats (qui contiennent la moelle osseuse hématopoïétique) conduisent, de façon plus ou moins sévère, à une myélotoxicité. Les cellules souches hématopoïétiques ont un fort pouvoir d'autorenouvellement et de différenciation pour assurer une homéostasie constante des éléments figurés du sang. Ainsi, elles doivent impérativement adapter les mécanismes de réparation de l'ADN dont elles disposent de façon adéquate pour surmonter cette myélotoxicité.

On peut diviser les mécanismes de réparation de l'ADN en deux grands groupes.

Les mécanismes assurant une réparation fidèle de l'ADN ; ils corrigent les dégâts constitués d'une modification chimique d'une base endommagées. Ils conduisent à la synthèse d'un nouveau brin. Ces mécanismes sont au nombre de cinq :

- le système BER (Base Excision Repair),
- le système NER (Nucleotide Excision Repair),
- le système MMR (MisMatch Repair),
- les recombinaisons et
- la réversion directe.

La synthèse translésionnelle est un mécanisme de réparation moins « performant » moins fidèle, pouvant entraîner l'accumulation de mutations ponctuelles [*Fuchs R, 2005, Friedberg EC, 2003*]. Elle utilise des polymérases spécifiques [*Friedberg EC, 2003*], appelées « sloppy » que l'on pourrait traduire par « bâcleuses » Ces ADN polymérases additionnent sur le brin opposé à la lésion des nucléotides [*Friedberg EC, 2005*]. L'obstacle de l'erreur est ainsi court-circuité induisant des mutations aléatoires sur la nouvelle séquence synthétisée.

L'activation de ces différents systèmes à lieu dès lors qu'une lésion de l'ADN est reconnue par des molécules détectrices qui induisent le recrutement d'autres partenaires moléculaires pour arrêter le cycle cellulaire et pour réparer les lésions ce qui permet ; dans le meilleur des cas, la correction du ou des dommages.

III.1. Le système Base Excision Repair ou BER

Il permet la réparation des cassures simple brin, en faisant intervenir des ADN glycosylases qui vont transformer la base endommagée en un site abasique qui sera reconnu par une endonucléase APE1, capable d'hydrolyser le lien 5'phospho-diester. Ceci a pour but d'interrompre le brin d'ADN. Cette interruption est reconnue par les facteurs XRCC1 et PARP1. La nouvelle synthèse² du brin n'est alors possible que si PNK (polynucléotide kinase) phosphoryle l'extrémité 5' et déphosphoryle l'extrémité 3'. Enfin, le nucléotide manquant est remplacé par l'action de l'ADN polymérase β [*Hoeijmakers JH, 2001, Fortini P, 2003, Whitehouse, 2001*]

III.2. Le système Nucleotide Excision Repair ou NER

Ce système fait intervenir les protéines XP [*Friedberg EC, 2001*]. On distingue deux voies :

- la GG-NER, (Global Genome NER) qui répare l'ADN quelque soit la localisation de l'anomalie dans le génome

- la TC-NER, (Transcription Coupled NER) qui intervient sur les lésions des régions transcrites [Friedberg EC, 2001, Friedberg EC, 2003, Hoeijmakers JH, 2001]

L'ouverture de la double hélice est initiée et maintenue par les hélicases XPD (ERCC2) [Friedberg EC, 2003] et XPB (ERCC3) associées au complexe de transcription TFIIH. Ainsi, la lésion devient accessible pour le complexe XPA-RPA où XPA identifie la lésion et RPA se lie au simple brin sain de l'ADN. L'endonucléase XPG (ERCC5) coupe le brin endommagé en 3' de la lésion. L'ADN endommagé est coupé en 5' de la lésion par XPF (ERCC4)-ERCC1 excisant un fragment simple brin. Finalement, une ADN polymérase (δ ou ϵ) et une ligase reconstituent le brin [Friedberg EC, 2001, Friedberg EC, 2003, Hoeijmakers JH, 2001].

III.3. Le système Mismatch Repair ou MMR

Post répliquative, l'activation du MMR est liée à la présence de bases mal appariées (erreur d'incorporation par les ADN polymérase δ et ϵ lors de la réplication) ou hétéroduplexes. La reconnaissance est faite par un hétérodimère associant soit MSH2 à MSH6 soit le couple MSH2-MSH3 en cas de petites insertions-délétions. Puis ces dimères recrutent MSH1 et PMS2.

Ce complexe MSH2-MSH6/3-MLH1-PMS2 va glisser sur l'ADN et s'éloigner du mésappariement. Ce groupe va distinguer le brin contenant la base erronée de l'autre brin, précisément où il existe une interruption des brins (fragments d'Okazaki ou du côté 3'OH libre du brin direct). Une exonucléation par EXOI-PCNA suit cette reconnaissance pour dégrader le brin mésapparié. Le brin est alors resynthétisé et une ligase IV rétablit la continuité de l'ADN.

III.4. Recombinaisons de l'ADN

La recombinaison permet la réparation des cassures double brin.

Deux molécules senseurs de la famille des PI3K (Phosphatidyl Inositol Kinase related protein Kinase) entrent en jeu : ATM et ATR [Kurz EU, 2004, Shiloh Y, 2003].

On distingue deux grandes voies de recombinaison :

- la recombinaison homologue (RH)
- la recombinaison non homologue des extrémités ou end joining (NHEJ).

La RH se sert, comme modèle, du chromosome homologue contenant la séquence homologue non endommagée [Friedberg EC, 2003, Reliene R, 2007]. ATM vient phosphoryler le complexe MRN (Mre11-Nb1-Rad50) au niveau des extrémités de la cassure [D'Amours D, 2002]. Le complexe est doté d'une activité 5'-3'-exonucléase qui va générer deux extrémités simple brin 3', immédiatement recouverte par RPA [Hoeijmakers JH, 2001]. La recombinaison commence : RPA est déplacé par Rad51, Rad52 et Rad54, accompagnés de la création de nucléofilaments autour de ces extrémités 3', en présence de Brca1 et de Brca2.

Rad51 possède une activité recombinase qui va permettre la reconnaissance de la séquence homologue sur la chromatide sœur.

La NHEJ permet quant à elle de joindre les extrémités double brin induites par la cassure après la reconnaissance de la lésion [Hoeijmakers JH, 2001, Lieber MR, 2010, Stracker TH, 2004]. Cette jonction est possible par l'intervention d'un gros complexe comprenant la DNA-PK (possédant une sous unité catalytique), des molécules Ku et Artémis. Cette dernière molécule est

phosphorylée par la DNA-PK, ce qui va activer sa portion 3'-5-exonucléase afin de bien proposer ces extrémités avant la ligation par le complexe XRCC4-ligase IV pour la restauration de la continuité de la double hélice [Ma Y, 2002].

III.5. La réversion directe

Elle permet la réparation, après la création d'une O₆ méthylation d'une guanine, par l'action d'une méthylguanine methyltransférase (MGMT). Ainsi, le groupement méthyl de l'O₆ guanine est transféré de manière irréversible sur un résidu cystéine de la MGMT. Cet ensemble subit ensuite une protéolyse faisant disparaître l'anomalie [Xu-Welliver M, 2002].

IV. MECANISMES FONDAMENTAUX DE L'ONCOGENESE

IV.1 Généralités

On distingue classiquement six mécanismes fondamentaux à l'œuvre dans l'oncogénèse. On peut y adjoindre l'instabilité génétique, qui permet à la cellule cancéreuse d'explorer avec succès, selon le modèle de la sélection darwinienne, les voies les plus diverses qui lui permettront de subsister, de proliférer et d'envahir les tissus voisins et distants.

Ces six mécanismes fondamentaux sont les suivants :

- indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération,
- perte du contrôle du cycle cellulaire,
- perte des capacités d'apoptose,
- acquisition du phénotype d'immortalité des lignées cellulaires,
- développement des capacités d'invasion et de métastase,
- mise en place d'une angiogénèse spécifique à la tumeur.

Les deux derniers mécanismes ne seront pas traités, car ne s'appliquent que peu aux leucémies myéloïdes, étant surtout des tumeurs « liquides ».

L'instabilité génétique passe par l'altération des capacités de réparation de l'ADN. Il existe des altérations génétiques du type « gain de fonction » (oncogènes) ou du type « perte de fonction » (gènes suppresseurs de tumeurs).

IV.1.1. Nature des oncogènes

On considère comme oncogènes tous les gènes dont la régulation positive participe au processus oncogénique, à chacun des niveaux mentionnés ci-dessus ; les protéines résultant de cette altération génétique, quantitative (protéine produite en excès) ou qualitative (protéine mutée hyperactive ou non régulée), prennent le nom d'oncoprotéines. Quelques exemples sont donnés ci-dessous :

- Protéines impliquées dans la transduction des signaux de prolifération :
 - . facteurs de croissance : FGF, PDGF
 - . récepteurs des facteurs de croissance : EGF-R, Erb-B2, Kit
 - . protéines adaptatrices de la transduction des signaux : protéines Ras
 - . tyrosine kinases cytoplasmiques : protéines Src, Abl
 - . sérine-thréonine kinases cytoplasmiques : protéines Raf, Mek, Erk

. facteurs de transcription : Myc, Fos, Jun

- Protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire :
 - . cyclines : cycline D1
 - . kinases cycline-dépendantes : Cdk4
 - . phosphatases : Cdc25
- Protéines régulant négativement l'apoptose :
 - . protéines de la famille Bcl2 : Bcl2, Bcl-XL
 - . autres protéines : survivine
- Protéine permettant l'immortalité des lignées cellulaires :
 - . télomérase

IV.1.2. Nature des gènes suppresseurs de tumeur

On considère comme gène suppresseur de tumeur, tout gène dont la perte de fonction participe à l'oncogenèse, même si, *stricto sensu*, sa réactivation n'entraîne pas la suppression du phénotype cancéreux comme le voudrait cette dénomination. Les exemples peuvent être retrouvés au niveau des mécanismes fondamentaux de l'oncogenèse :

- Régulateurs négatifs de la transduction des signaux de prolifération :
 - . protéine Gap, activant la fonction GTPasique de Ras
 - . protéine Pten, contrecarrant l'action de la PI3 kinase
- Régulateurs négatifs de l'avancée des cellules dans le cycle :
 - . protéine Rb, inhibiteur décisif de l'entrée des cellules dans le cycle
 - . protéines inhibitrices des complexes Cdk-cyclines : p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, p27^{KIP1}
- Régulateurs positifs de l'apoptose :
 - . protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2 : Bax, Bad, Bid
 - . ligands et récepteurs des messages de mort cellulaire : TNF, Trail, FasL
 - . protéines exécutrices de l'apoptose : caspases
- Protéines mises en jeu dans la réparation de l'ADN :
 - . protéine p53
 - . protéines de réparation des mésappariements des nucléotides: MLH1, MSH2.

Certains gènes suppresseurs de tumeur jouent un rôle fondamental dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et la perte de leur fonction est un facteur primordial dans l'oncogenèse: on les appelle gènes *gatekeepers* et l'exemple en est la protéine Rb ou la protéine Pten ; d'autres jouent un rôle plus tardif en favorisant l'oncogenèse sans l'induire : ce sont surtout les gènes de réparation de l'ADN et on les appelle gènes *caretakers*.

Les mécanismes conduisant à la perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeurs sont souvent distincts de ceux conduisant à l'activation d'un oncogène. Les mutations ponctuelles, inactivatrices de la fonction du gène, sont un mécanisme fréquent ; on rencontre également le phénomène de perte d'hétérozygotie (LOH, pour *loss of heterozygosity*) souvent dû à la perte de toute une région chromosomique lors d'une mitose pathologique, conduisant à une situation d'hémizygotie. Cette hémizygotie est délétère si le gène ainsi restant est lui aussi inactivé par de nombreux mécanismes incluant l'épigénétique. Enfin, dans certains cas, l'altération d'un seul

allèle d'un gène suppresseur de tumeur peut contribuer à l'oncogenèse, comme le montrent certains développements récents [Berger AH, 2011].

IV.1.3. Gènes suppresseurs de tumeur et prédispositions aux cancers

Le concept de gène suppresseur de tumeur a été développé à partir du rétinoblastome bilatéral, parfois familial et de l'observation de la délétion du 13q constitutionnelle dans certains de ces cas, contrastant avec les rétinoblastomes unilatéraux et sporadiques. Le mécanisme « à deux coups » décrit par Knudson rend compte de cette observation. Un des deux allèles est altéré dans la totalité des cellules de l'organisme à partir de la lignée germinale. Le second événement survient de façon sporadique sur le deuxième allèle d'une cellule somatique de chaque rétine entraînant la transformation. Cette hypothèse a été validée par les progrès importants de la génétique humaine. Elle explique les syndromes de prédisposition héréditaire aux cancers transmis sur le mode dominant. A chaque gène suppresseur de tumeur est associé un syndrome de prédisposition héréditaire aux cancers, se manifestant parfois simplement par un risque élevé de développer un cancer mais parfois accompagné d'une pathologie caractéristique. On peut citer certains gènes tels *BRCA1/BRCA2* et une prédisposition aux cancers héréditaires du sein, *NF1* et la neurofibromatose de type 1, *TP53* et le syndrome de Li-Fraumeni, *WT1* et le néphroblastome parfois associé à une délétion de 11p13 dans les cas familiaux et/ou bilatéraux.

D'autres maladies constitutionnelles de transmission récessives peuvent prédisposer à la transformation maligne telles l'ataxie télangiectasie avec son gène *ATM* qui présente une instabilité chromosomique au niveau des récepteurs T. L'anémie de Fanconi (AF), avec sa prédisposition aux SMD et aux LAM, est provoquée par des doubles mutations sur au moins 15 gènes possibles: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCI/BRIP1*, *FANCL*, *FANCN/PALB2*, *FANCM*, *FANCO/RAD51C*, *FANCP*. Outre un syndrome malformatif et l'anémie grave d'origine centrale, s'y associent des cassures chromosomiques dont certaines figures d'échanges comme des figures quadriradiales ou triradiales. Ces anomalies chromosomiques non systématisées, sont présentes spontanément en culture de sang +PHA de 72h. Elles peuvent être augmentées par une hypersensibilité des cellules d'AF aux agents alkylants bifonctionnels. De plus il existe des anomalies dans les mécanismes de réparation de l'ADN et un passage plus lent des cellules à passer de la phase G2 à la phase M.

IV.2. Principes des mécanismes d'action d'agents anticancéreux potentiellement leucémogènes

Les différents sous chapitres suivants ne concerneront essentiellement que les agents alkylants, les anti-topoisomérases II et la radiothérapie.

IV.2.1. Les Agents Alkylants (AA)

L'alkylation est le transfert d'un groupe alkyl d'une molécule à une autre en créant en général une liaison covalente. Cette réaction permet de rajouter des radicaux chimiques à des molécules cibles. Les agents alkylants utilisés en thérapeutique créent des liaisons covalentes via

des groupes alkyl sur différents constituants de la cellule, dont l'ADN qui est considéré comme la cible principale.

La plupart des AA sont des agents méthylants monofonctionnels tels que temozolomide, N-méthyl-N⁷-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), dacarbazine (voir tableau 2)

Les autres AA sont bifonctionnels tels que les moutardes (chlorambucil, cyclophosphamide, melphalan) ou les agents chloro-ethylants (mustine, carmustine, lomustine et fotemustine) (voir tableau 2).

IV.2.1.1. Les AA monofonctionnels

IV.2.1.1.1. Mécanismes d'action

Les agents méthylants monofonctionnels fixent des radicaux méthyls sur les atomes N et O des bases nucléiques. Cela crée des dommages à l'ADN, de type faux sens, cassure simple brin ou dépurination qui provoquent mutations, cancérogenèse mais surtout mort cellulaire. Les liaisons à partir des N-méthylations représentent plus de 80 % des bases méthylées [Kondo N, 2010]. Les méthylations de ces bases « alkylées » ont différents niveaux de stabilité.

La méthylation en N⁷-methylguanine (N⁷MeG) a été identifiée comme la N-méthylation la plus stable et prolongée dans le temps [Beranek DT, 1990]. La O⁶-méthylation a également un caractère stable [Goth-Goldstein R, 1980 – Kaina B, 1990].

Bien que les O-alkylations soient minoritaires dans les mécanismes d'alkylation, celles-ci sont bien plus génotoxiques et mutagéniques que les N-alkylations. Ces dernières sont quant à elles plus cytotoxiques [Goth R, MF, 1974, Kaina B, 1990]

IV.2.1.1.2. Mécanismes de réparation de l'ADN utilisés par la cellule

Il existe différents intervenants.

Le système BER va intervenir au niveau de N⁷MeG, N³MeA et N³MeG. Une DNA glycosylase spécifique, l'alkyladénine DNA glycosylase (Aag) va agir en premier rendant les bases apuriques ou apyrimidiques. Puis, APE1 qui reconnaît ces bases apuriques ou apyrimidiques, va retirer les groupes 3'-OH et 5'-desoxyribosephosphate (5'dRP) cytotoxiques. L'ADN polymérase β reconstruit la partie nucléotidique manquante et relie également le groupe 5'dRP. Enfin, la DNA ligase I ou II et XRCC1 termine le processus. Il a été montré qu'en l'absence de la polymérase β , le 5'dRP persiste dans la cellule la rendant très sensible au méthylméthanesulfonate [Sobol RW, 1996, Sobol RW, 2002]

Il existe aussi un système homologue AlkB chez l'homme hABH, qui intervient au niveau de N¹MeA, N³MeC, N³MeT et N¹MeG. [Karina B, 2007]. Cette enzyme a une action oxydative déméthylase présente sous deux isoformes hABH2 qui intervient essentiellement au niveau de la fourche de réplication en phase S et la majorité du système repose sur l'isoforme hABH3.

L'action de la MethylGuanine DNA Methyltransférase (MGMT) sur les lésions O⁶MeG permet le transfert du groupe alkyl depuis l'atome O de la guanine vers un résidu cystéine. Si cette enzyme est déficiente, la cellule se trouve dans l'incapacité de réparer l'ADN. [Day III RS 1980]

Le système MMR intervient aussi. On s'est aperçu que plus le système MMR est fonctionnel plus les cellules sont sensibles à l'action des AA. Lorsque ce mécanisme ne fonctionne pas les cellules

ne meurent pas, bien qu'il y ait une accumulation de multiples détériorations de l'ADN [Karran P, 2001, Stojic L, 2004].

IV.2.1.2. Les AA bifonctionnels

IV.2.1.2.1. Mécanismes d'action

Les AA bifonctionnels présentent deux sites alkyl leur permettant de réaliser soit un pont covalent entre l'ADN et des protéines, soit un pont entre deux bases d'ADN en intra brin ou en inter brin. Ils provoquent des lésions de l'ADN de type cassures double brin voire des cassures plus complexes. Les ponts extensifs inter brins bloquent la fourche de réplication lors de la phase S et ont ainsi une action très toxique pour la cellule et la mitose. A dose convenable, ils provoquent des cassures chromosomiques multiples, des chromosomes dicentriques, des figures tri et quadriradiales [Savage JRK, 1999].

Les moutardes provoquent des liaisons $N^7G:N^7G$, tandis que les nitrosourées réalisent des liaisons $N^1G:N^3C$.

IV.2.1.2.2 Mécanismes de réparation de l'ADN utilisés par la cellule

Ici aussi, c'est la Méthylguanine DNA méthyltransférase qui va réparer les lésions $N^1G:N^3C$ entraînées par les nitrosourées.

En revanche, la réparation des lésions interbrins est plus complexe en associant l'action du FA, de NER, de la synthèse trans-lésionnelle et de la RH [Thompson LH, 2009].

Les protéines FANCM et FANCA associating polypeptide 24 vont former un hétérodimère capable de fixer l'ADN au niveau de la fourche de réplication lorsque celle-ci a été bloquée.

Les protéines XPF et ERCC1 du système NER vont alors couper l'ADN de part et d'autre de la lésion interbrin. Le segment manquant va alors être remplacé par les polymérase ζ du système de synthèse trans-lésionnelle.

Enfin la RH est activée lorsque FANCD2 est ubiquitinée par le complexe FA.

IVI.2.2 Les anti topoisomérases II (ATII)

IV.2.2.1. Mécanismes d'action

Les ATII empêchent la topoisomérase II de fonctionner lors de son action de religation des 2 brins de l'ADN qu'elle vient de couper. Il en résulte une cassure double brin.

On distingue 2 groupes d'ATII : les épipodophyllotoxines représentées par leur chef de file l'étoposide et les anthracyclines telles que l'épirubicine (voir tableau 2)

Ces 2 types de molécules induisent plutôt des échanges de matériel nucléosidique équilibrés mais distincts car les points de cassure ne sont pas identiques.

Les épipodophyllotoxines induisent préférentiellement des réarrangements au niveau de la région 11q23 et quelques fois en 21q22 alors que l'épirubicine donne naissance à des translocations t(15;17) propres aux LAM 3.

L'aspect cytologique particulier de t-LAM monoblastiques avec une t(v;11q23) après étoposide avait été bien noté par l'équipe de Ratain et al. en 1987 [Ratain MJ, 1987] soit bien différent des t-LAM post AA.

IV.2.2.1.1. Le point de cassure 11q23 post étoposide

La plupart des réarrangements du gène *MLL* (qui mesure 120 Kb) provoque la fusion de celui-ci en 5' avec d'autres gènes partenaires. La zone de fusion représente quant à elle 8,3 Kb. Ces types de réarrangements sont aussi bien retrouvés dans les LAL que dans les LAM. Les translocations t(9;11), t(6;11) et t(11;19) sont les plus fréquemment affichées par les LAM.

L'équipe de Langer [Langer T, 2003] a travaillé sur des leucémies aiguës avec une t(9;11) aboutissant à la fusion chimérique *AF9-MLL*. On comptait parmi 11 patients étudiés, 5 t-LAM post ATII sans avoir reçu une épipodophyllotoxine. Le point de cassure passant par *MLL* était identique au niveau de la partie télomérique de l'intron 8, au milieu de la région de coupure-attachement et très proche du site de fixation de la topoisomérase II (appelé scaffold attachment region ou SAR).

MLL représente un point de cassure visé par l'ensemble des ATII qui n'est pas exclusif au épipodophyllotoxines.

IV.2.2.1.2. La translocation t(15;17) post épirubicine

L'équipe de Mays [Mays AN, 2010], montre que les points de cassures retrouvés sont localisés aux introns 6, 3 et dans l'exon 7 du gène *PML*. L'atteinte de l'intron 6 n'est pas la même que celle induite par la mitoxantrone. Le point de cassure se situe au niveau de l'intron 2 du gène *RARA*.

L'ensemble de ces points de cassure de la translocation (15;17) est ainsi préférentiellement ciblé par l'épirubicine et ces lésions induites sont stables. Les extrémités en 5', générées par la topoisomérase II en *PML* et *RARA* occasionnent alors la mise en route du système NHEJ des cassures double brin. Les auteurs suggèrent que les cassures double brin dans des régions de susceptibilité aux ATII sont réparées de façon aberrante.

Il est supposé qu'après une aplasie post chimiothérapie, les cellules progénitrices hématopoïétiques vont, chez certains patients, prendre un avantage sélectif lorsqu'elles possèdent cette translocation de type t(15;17).

IV.2.2.1.3. La translocation t(9;22)

La translocation équilibrée t(9;22) que l'on peut retrouver dans des t-LAM, ne semble pas être spécifique d'un agent inducteur tel que les ATII. Cette translocation peut également être induite par les AA, la radiothérapie ou même le benzène. Ceci laisse suggérer que ces points de cassure en 9q34 et 22q11 ne seraient pas vraiment spécifiques dans un contexte de t-LAM. [Lichtman MA, 2008]

IV.2.2.2. Mécanismes de réparation de l'ADN employés par la cellule

La topoisomérase II est constituée de 2 isoenzymes Top2 α et Top2 β . Leur rôle se distingue au niveau de la réplication et de la ségrégation des chromosomes pour la Top2 α tandis que la Top2 β est plutôt impliquée dans la transcription. Un travail en 2007 mené à la fois en Grande Bretagne et aux Etats Unis [Azarova AM, 2007] a élaboré un modèle de carcinogénèse post étoposide, mettant en avant une voie préférentiellement utilisée par cet agent qui va se lier à la Top2 β . Ce complexe crée de façon stable des cassures double brin. Ces cassures ne sont pas dégradées par le protéasome et vont être traitées par le système NHEJ et aboutir à des réarrangements faisant entrer la cellule dans un processus carcinogène.

Les cassures double brin peuvent être réparées selon les 2 systèmes de recombinaison:

- le NHEJ
- la recombinaison homologue (RH)

Le NHEJ fonctionne grâce au complexe XRCC4/ADN ligase IV et à un complexe dépendant de la DNA-PK. NHEJ est prédominant lors du passage de la phase G1 vers la phase S.

L'équipe de Coiteux en 2007 [Coiteux V,2007] a montré qu'un défaut constitutionnel dans la voie NHEJ ne prédisposait probablement pas à des t-LAM avec t(9;11) ou t(15;17). En effet, ils n'ont pas retrouvé de différence entre une réparation des cassures double brin dans les cellules provenant de patients ayant développé une t-LAM post ATII et des cellules contrôle issues respectivement de patients ayant été aussi traités par des ATII sans avoir développé de t-LAM. Selon eux, le système de RH pourrait être impliqué dans les t-LAM post ATII ainsi que les polymorphismes de *RAD51*.

IV.2.3 La radiothérapie

L'action des radiations ionisantes se déroulent en trois phases (physique, physico-chimique et biologique) aboutissant à l'altération de l'ADN. Ainsi on observe :

- des cassures simple brin sans gap, par rupture des ponts diester ; elles sont non létales car réparables par une ligase,
- des cassures simple brin avec gap, par perte d'un sucre et d'une base ; elles nécessitent un temps de réparation plus long,
- des altérations des bases, non létales mais pouvant être à l'origine d'une mutation en cas de non réparation ou de réparation fautive. Ces lésions sont réparées à 80% dans les 15 minutes suivant l'irradiation par des mécanismes d'excision-resynthèse faisant intervenir endonucléases, glycosylases, polymérase et ligases,
- des cassures double brin, qui peuvent résulter d'un événement touchant les deux brins simultanément ou de deux cassures simple brin indépendantes. Chaque cassure double brin est létale en cas de non-réparation.

Les mécanismes de réparation de l'ADN les plus souvent utilisés par la cellule sont ainsi, le système BER et la recombinaison.

Les patients habitants aux alentours de Hiroshima ou du site de Tchernobyl sont des sujets qui ont présentés ou présentent encore des cancers solides ou des hémopathies secondaires aux radiations ionisantes.

Tableau 2 - Classification des agents de chimiothérapie par leur mécanisme d'action

Mécanisme d'action/ classe thérapeutique	Agent
<u>AGENTS ALKYLANTS</u> Moutarde à l'azote Nitrosurée Sels de platine Alkylsulfonate Hydrazine Triazene Aziridine	Chlorambucil**, cyclophosphamide**, ifosfamide**, melphalan**, Caryolysine Carmustine**, lomustine** Carboplatine**, cisplatine**, oxaliplatine** Busulfan*, treosulfan* Procarbazine* Dacarbazine* Thiotépa*
<u>ANTIMÉTABOLITES</u> Acide folique Antagonistes puriniques Antagonistes pyrimidiques	Méthotrexate Cladribine, clofarabine, fludarabine, mercaptopurine Cytarabine, décitabine, azacitidine, fluoro-uracil, gemcitabine
<u>ANTITUBULINES</u> Vinca-alkaloïdes Taxanes	Vinblastine, vincristine, vindésine, vinorelbine Docetaxel, plaxitaxel
<u>INHIBITEURS DE LA TOPOISOMÉRASE II</u> Etopodophyllotoxine	Etoposide, teniposide
<u>INHIBITEURS DE LA TOPOISOMÉRASE II ET AGENTS INTERCALANTS</u> Anthracyclines Anthracènedione Streptomyces	Daunorubicine, doxorubicine, épirubicine, idarubicine Mitoxantrone Actinomycine, bléomycine***, mitomycine***

* AA monofonctionnel

**AA bi fonctionnel

*** Cassures double brin de l'ADN par un mécanisme mal connu

D'après Kayser et al Blood, 2011, 117 :2137-2145

IV.2.4 En résumé

Les mécanismes de transformation de cellules médullaires normales, des progéniteurs, peuvent résulter d'anomalies chromosomiques stables (délétions, translocations...), de la mise en défaut des mécanismes de réparation de l'ADN laissant passer ces anomalies de cycle en cycle dans les différentes lignées granuleuses (la dysmyélopoïèse se généralisant surtout après l'exposition aux AA ou aux radiations ionisantes).

Toute la connaissance des mécanismes leucémogènes induits n'est pas encore aboutie. Un grand nombre d'anomalies de l'ADN empruntent des voies communes pour parvenir à une leucémisation soit *de novo* soit induite. De plus, tout patient exposé à un traitement antinéoplasique ne développera pas un cancer secondaire.

IV.2.4.1 Relations entre chimiothérapie avec agents alkylants, mécanismes de réparation de l'ADN et les t-LAM

Bien que de nombreux travaux aient porté sur les mécanismes aboutissant aux anomalies induites sur l'ADN après traitement par les AA, aucune molécule impliquée n'a été clairement mise en évidence [Guillem V, 2008]

Les AA possèdent un ou deux groupes d'interaction covalente avec les centres nucléophiles de l'ADN [Chaney SG, 1996]. Ces centres sont présents dans les 4 bases mais les atomes N1 et N3 de l'adénine, N3 de la cytosine [Beranek DT, 1980 ; Engelward BP, 1998 ; Lui WO, 2002] et N7 et O6 de la guanine [Chen FX, 1993] sont plus particulièrement réactifs comme on a pu le voir plus haut.

On note que la cytotoxicité semble être proportionnelle au nombre de doubles ponts [Ludlum DB, 1990]

Lorsque l'on compare le melphalan au cyclophosphamide on s'aperçoit que le premier médicament est 10 fois plus toxique que le second : ce premier induit plus de double-ponts (ratio simple/double égal à 33% contre 6,9% pour le second [Curtis RE, 1992]

La formation des cassures doubles brins est due au fait que les lésions toxiques inhibent la réplication lors de la division cellulaire [Worrillow LJ, 2006]

Certaines régions des chromosomes 5, 7, 11 et 17 sont souvent remaniées ; ce sont des chromosomes fréquemment réarrangés et délétés dans les t-LAM post AA [Mamuris Z, 1989]

IV.2.4.2 Relations entre chimiothérapie avec anti topoisomérases II, mécanismes de réparation de l'ADN et les t-LAM

La mise en évidence de translocations équilibrées dans ces t-LAM repose sur le postulat suivant : apparition des clivages double brin suivie de l'accumulation des cassures double brin [Pfeiffer P, 2000]

Lors de la création du complexe ATII-ADN, celui-ci va entrer en collision dans la fourche de réplication ou la machinerie transcriptionnelle. Ainsi, l'ADN est fragmenté en plusieurs brins (simples ou doubles) [Larsen AK, 2003]

Plusieurs équipes ont démontré que les ATII induisent des cassures double brin au niveau de sites spécifiques de clivage de l'ADN au sein de loci pour les facteurs transcriptionnels hématopoïétiques tels que *MLL*, *RUNX1/CBFB*, *RARA* ou *NUP98* [Stanulla M, 1997 ; Nishiyama M, 1999 ; Lovett BD, 2001 ; Mistry AR, 2005] De plus il a été montré que les ATII préviennent le rejointoiement des cassures double brin [Tewey KM, 1984]. Ce phénomène augmenterait le

nombre de recombinaisons anormales entre les morceaux de doubles brins d'ADN et les chromosomes voisins [Pedersen-Bjergaard 2006]

Stanulla [Stanulla M, 1997] a émis le postulat suivant : le site de clivage spécifique de l'ADN double brin, suivi d'une réparation anormale, avec religation de l'ADN à une région génomique discontinue, peut représenter le mécanisme moléculaire initial aboutissant aux translocations des t-LAM post ATII.

V. ANOMALIES CYTOGENETIQUES ET GENETIQUES RECURRENTES

Vieille de près d'un siècle, l'hypothèse de Boveri selon laquelle le cancer serait une maladie chromosomique de la cellule, a été amplement démontrée par la cytogénétique et la génomique des proliférations malignes au cours de ces cinquante dernières années. Les anomalies chromosomiques (et par extension, génomiques) acquises (car uniquement observées dans les cellules tumorales) peuvent être de toute nature: de nombre ou de structure, équilibrées (sans anomalie quantitative) ou déséquilibrées (avec des pertes ou des gains). Le caractère monoclonal (c'est-à-dire dérivant d'une seule cellule porteuse d'une anomalie génétique initiale acquise) des proliférations tumorales est vérifié dans la plupart des cas sur la base de ces remaniements génomiques. Une cellule initiale, promue par la première anomalie, donnera naissance à des cellules filles. L'une d'entre elles pourra acquérir de nouvelles fonctionnalités via l'acquisition d'anomalies additionnelles de son génome, formant ainsi le clone tumoral (tableau A). Compte tenu du nombre de cellules exposées, ce mécanisme récurrent agit de façon massivement parallèle. La sélection fait ensuite son choix parmi les innombrables mutations produites pour sélectionner les plus favorables: vitesse de croissance, adaptation à un nouvel environnement, résistance aux traitements, etc. L'inactivation du check point télomérique introduit une instabilité chromosomique aboutissant à une sélection du clone ayant retrouvé une fonction de télomérase. Les anomalies chromosomiques résultent d'une sélection darwinienne pervertie et sont pour beaucoup liées intimement au processus tumoral. Ces remaniements successifs codent pour les étapes, souvent nombreuses, de la promotion, de la transformation et de la progression tumorale.

Tableau A - Types d'anomalies chromosomiques en oncologie

	Types d'anomalies	Gènes impliqués	Effet fonctionnel	Exemples
Type I	Gènes de fusion par translocation ou équivalent	Oncogènes, kinases....	Gain de fonction	BCR-ABL
Type II	Effet de position par translocation ou équivalent	Oncogènes, facteurs de transcription...	Dérégulation	MYC dans les t(8;14)(q24;q32)...
Type III	Gain de tout ou partie de chromosome	Oncogènes, autres gènes...	Dosage génique; (\pm gain de fonction)	Trisomie 8 de MET dans la trisomie 7...
Type IIIa	Amplification de gène(s) sous forme de dm* ou de hsr**	Oncogènes, autres gènes...	Surexpression de gène(s); (\pm gain de fonction)	Amplification d'ABL
Type IV	Délétion, perte chromosomique, isodisomie totale ou partielle, inactivation par mutation génique.	gènes suppresseurs de tumeur	Perte de fonction, hémi et homozygotie	-7, 7q-

* dm = doubles minutes = chromosomes minuscules doubles, micro anneaux acentriques qui peuvent être très nombreux dans le noyau

** hsr = homogenous staining region, région de nombreuses répétitions (amplification) d'une séquence dans un chromosome

Les principales anomalies chromosomiques en pathologie myéloïde sont résumées dans le tableau B, [Bernheim A, 2010]. Elles ont permis le clonage et l'isolement de nombreux oncogènes.

Depuis la publication en 2009 par Breems [Breems, 2009] sur le statut des LAM présentant un caryotype monosomique ou MK pour monosomal karyotype dans la littérature internationale, ce facteur prend de plus en plus d'importance dans la stratification pronostique. La définition est ainsi proposée par l'auteur. Une LAM MK est une LAM dont le caryotype contient au moins deux monosomies autosomales ou bien une monosomie autosomale associée à une anomalie de structure. Cela confère aux LAM MK un très mauvais pronostic (survie à 4 ans estimée à 3-4%) encore plus péjoratif que les LAM à caryotype complexe.

Ce critère cytogénétique va probablement devenir principal dans la stratification pronostique. Dans son article dédié à une mise à jour sur les LAM, l'European Leukemia Network propose d'ajouter un cinquième groupe pronostique réservé au statut MK [Estey EH, 2012].

C'est également en 2012 qu'un nouvel article précise, grâce à l'augmentation du nombre de patients étudiés, que le caractère pronostique des LAM MK semble plutôt assez proche de celui des LAM à caryotype complexe [Kayser S, 2012].

V.1 Anomalies cytogénétiques dans les t-LAM

Comme on a pu le voir plus haut, c'est en 2001 puis en 2008, que l'OMS distingue clairement les t-LAM comme une entité distincte. Les néoplasies myéloïdes induites sont incluses dans le groupe « Leucémies myéloïdes aiguës et néoplasies des précurseurs myéloïdes induites – therapy related myeloid neoplasm ».

Les t-LAM sont également des leucémies dont le pronostic est mauvais avec une survie bien moindre : moins de 25% des patients atteints restent vivant 4 ans après le diagnostic (contre près de 40% pour les p-AML) [Kayser S, 2011]

La majorité des moelles osseuses des patients atteints une t-LAM présente des anomalies chromosomiques clonales [Rowley JD, 1977 ; Le Beau MM, 1986 ; Rubin CM, 1991 ; Larson RA, 1992 ; Super HJ, 1993 ; Thirman MJ, 1996 ; Andersen MK, 1998 ; Andersen MK, 2002 ; Bloomfield CD, 2002 ; Zhang Y, 2002 ; Smith SM, 2003].

La plupart des anomalies génétiques sont de mauvais pronostic.

Les anomalies cytogénétiques sont semblables à celles que l'on trouve dans les p-LAM : perte partielle ou totale des chromosomes 5 et/ou 7, translocations équilibrées associées ou non à un remaniement du gène *MLL*, translocations de meilleur pronostic telles que la t(15;17), la t(8;21) ou l'inversion du 16. [Detourmignies L, 1992 ; Quesnel B, 1993 ; Pedersen-Bjergaard J, 1997]. La proportion de caryotypes complexes est plus importante dans les t-LAM mais on peut aussi retrouver des caryotypes normaux ou des trisomies « classiques » comme la trisomie 8 ou la trisomie 13.

Les atteintes des chromosomes 5 et 7 sont secondaires aux AA ou aux irradiations alors que les translocations, notamment celles impliquant *MLL* en 11q23 sont la conséquence de l'exposition aux ATII.

L'apparition des t-LAM se distingue également en fonction du type d'anomalies acquises.

Les t-LAM induites par les AA sont précédées d'une phase pré-leucémique myélodysplasique (t-SMD) qui s'acutise en moyenne en 6 mois. Cette phase peut survenir plusieurs années après le traitement anticancéreux (en moyenne 3 à 7 ans). On retrouve souvent les mêmes anomalies clonales que celles décrites dans les t-LAM.

Les t-LAM secondaires aux ATII n'ont pas de phase pré-leucémique et apparaissent beaucoup plus tôt dans le processus (en moyenne 2 ans après le début du traitement antinéoplasique).

Le tableau 3 résume ces caractéristiques. L'atteinte médullaire apparaît plus marquée dans les t-LAM avec bien souvent une atteinte multilignée.

Tableau B - Anomalies chromosomiques sélectionnées par le processus malin

Hémopathie	Anomalies Chromosomiques ¹	Gènes	Type
LAM, SMD			
LAM M2	t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	I
LAM M3 et variant	t(15;17)(q22;q11-12)	<i>PML-RARA</i>	I
LAML M3 atypique	t(11;17)(q23;q12)	<i>PLZF-RARA</i>	I
LAM M4Eo	inv(16)(p13q22) ou	<i>CBFB-MYH11</i>	I
	t(16;16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	I
LAML M5a et autres LAM	t(9;11)(p22;q23)	<i>MLL-MLLT3</i>	I
LAM M5a et autres LAM	t(11q23;V)	<i>MLL</i> multiple partenaires incluant <i>MLL</i>	I
Leucémie aigue mégacaryoblastique	t(1;22)(p13;q13)	<i>RBM15-MKLI</i>	I
LAM, SMD	t(3;3)(q21;q26) ou variants	<i>RPN1-EVII</i>	I
LAM, SMD	t(3;5)(q25;q34)	<i>MLF1-NPM1</i>	I
LAM, SMD	t(5;12)(q33;p13)	<i>PDGFRB-ETV6</i>	I
LAM, SMD	-5 /del(5q)	<i>RPS14</i>	IV
LAM, SMD	t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK-NUP214</i>	I
LAM, SMD	t(7;11)(p15;p15)	<i>HOXA9-NUP98</i>	I
LAM, SMD	-7 ou del(7q)	Nombreux gènes	IV
LAM, SMD	+8		III
LAM, SMD	t(8;16)(p11;p13)	<i>MOZ-CBP</i>	I
LAM, SMD	t(9;12)(q34;p13)	<i>ETV6-ABL</i>	I
LAM, SMD	t(12;13)(p13;q12.3)	<i>ETV6-CDX2</i>	I
LAM, SMD	t(12;22)(p13;q13)	<i>ETV6-NM1</i>	I
LAM, SMD	t(12;V)(p13;V), del(12p)	<i>ETV6L-V</i>	I

Tableau B – Suite

LAM, SMD	t(16;21)(p11;q22)	<i>FUS-ERG</i>	I
LAM, SMD	del(20q)		IV
t-LAM			
Post Alkylants et irradiation	-5 ou del(5q)		IV
Post Alkylants et irradiation	-7 ou del(7q)		IV
Post Anti topoisomeraseII	t(11q23;V)	<i>MLL-V</i>	I
Myéloprolifération chronique			
Leucémie myéloïde chronique (LMC)	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	I
Acutisation de LMC	t(9;22), +8,+Ph, +19, i(17q)	<i>BCR-ABL1</i>	I & III
Polycytemia vera	.+9p		III
Polycytemia vera	del(20q)		IV
SMD/SMP	t(8;9)(p21;p24)	<i>PCMI-JAK2</i>	I
Leucémie myéломocyttaire chronique	t(5;12)(q33;p13)	<i>PDGFRB-TEL</i>	I
Syndrome 5q-	del(5q)	<i>RPS14</i>	IV

1*= dérégulation du gène; - = gène de fusion; v = variant du réarrangement

2 : thérapie ciblée du gène impliqué dans les réarrangements génétiques

(pour plus de détails : <http://atlasgeneticsoncology.org>).

Tableau 3 – Mode de présentation des t-LAM.

	Post alkylants	Post anti topoisomereses II
Cytologie	phase pré leucémique, t-SMD	Pas de phase préleucémique
Anomalies cytogénétiques les plus fréquentes	-5, 5q- -7, 7q-	Translocations impliquant 11q23, t(8;21), inv(16) t(15;17)

En 2005 Larson et al [*Larson RA, 2005*] a publié un travail portant sur 306 patients atteints d'une t-LAM (ou d'une t-SMD). Tous ont été traités antérieurement d'une hémopathie maligne primaire (171/306) ou d'une tumeur solide (117/306). Ils ont tous reçu une chimiothérapie ou une radiothérapie ou les deux. Les 18 patients restants ne présentaient pas de néoplasie. Les résultats cytogénétiques sont repris dans le tableau 4:

Tableau 4 – Résultats cytogénétiques des 306 t-LAM étudiées par Larson et al.

Caryotype	Nombre de patients (%)
Normal	24 (8)
Anomalies clonales	282 (92)
Atteinte du chromosome 5 seul	63 (21)
Atteinte du chromosome 7 seul	85 (28)
Atteinte des chromosomes 5 et 7	66 (22)
Translocations impliquant 11q23	10 (3)
Translocations (3;21), (8;21) ou t(v;21q22)	8 (3)
Translocation (15;17)	6 (2)
Inversion du 16	6 (2)
Translocation (8;16)	1 (0.3)
Autres anomalies chromosomiques (trisomie 8, perte partielle ou totale du 13, trisomie 21, trisomie 11, délétion (20q)...))	39 (13)

On s'aperçoit que les anomalies clonales les plus fréquentes sont la perte du chromosome 5 et 7 (totale et partielle) soit 70% alors que les translocations équilibrées ne représentent que 10%. L'ensemble de ces anomalies cytogénétiques est similaire aux p-LAM. Ces sont les fréquences qui diffèrent : elles sont moins élevées dans les p-LAM. Un travail plus récent portant sur 2853 patients atteints de LAM (200 t-LAM et 2653 p-LAM) a montré que 75% des t-LAM comportaient des anomalies génétiques contre 51% des p-LAM. Les anomalies du chromosome 5 et 7 représentaient 45% des cas de t-LAM contre 18% des p-LAM. De même les t-LAM comprenaient 26% de caryotypes complexes contre 11% des p-LAM. Enfin les anomalies en

11q23 représentaient 15% et 3% des cas de t-LAM et p-LAM respectivement. [Kayser S, 2011]. La conclusion du travail de Preiss [Preiss BS, 2010] est moins nuancée. L'auteur a suggéré que les anomalies cytogénétiques entre p-LAM et t-LAM étaient identiques mais la distinction franche entre les t-LAM et les LAM secondaires à une myélodysplasie n'a pas été effectuée.

Les mécanismes d'altération de l'ADN aboutissant soit à des délétions chromosomiques soit à des translocations équilibrées pourraient expliquer les temps de latence différents entre les t-LAM post AA et les t-LAM post ATII [Fenske TS, 2006].

Lorsqu'il y a délétion chromosomique, un allèle d'un supposé gène suppresseur de tumeur pourrait être perdu. Le second allèle devrait également être altéré avant que la cellule n'acquière un avantage prolifératif. Toutefois, la perte des deux allèles de gène suppresseur de tumeur ne peut pas suffire pour conférer à la cellule souche médullaire un caractère malin comme on peut le voir dans la cancérogenèse du cancer colorectal [Godley LA, 2008]. La série de changements génétiques doit probablement nécessiter un laps de temps pouvant expliquer le temps de latence observé dans les t-LAM post AA. A l'inverse, les t-LAM avec translocation équilibrée résultent dans l'activation d'oncogènes. La création d'un gène chimère va s'exprimer sur un mode dominant, comme le gène *MLL* qui possède plus d'une soixantaine de partenaires de fusion parmi lesquels *NUP98* (transporteur nucléocytoplasmique) ou *AF9* (facteur transcriptionnel). On pense également que seule cette fusion ne suffit pas à transformer la cellule en une cellule maligne, toutefois le nombre d'événements supplémentaires doit être inférieur à celui des t-LAM post AA. [Godley LA, 2008].

L'équipe de Pedersen-Bjergaard a présenté de nombreux travaux sur les t-LAM. Elle en est venue à présenter 8 voies génétiques différentes pour expliquer le déroulement de type multi étapes des t-LAM. (Voir figure 2)

La voie I comprend les t-LAM avec une anomalie du chromosome 7 sans anomalie du 5 ni translocation équilibrée. Ces t-LAM sont précédées d'une phase pré leucémique et sont secondaires aux AA. L'association avec des mutations de *RUNX1* est fréquente [Harada H, 2003].

La voie II comprend les t-LAM avec une anomalie du chromosome 5, sans translocation équilibrée mais souvent au sein d'un caryotype complexe. Ce sont des t-LAM avec ou sans phase pré leucémique. Il existe souvent une mutation de *TP53*. Ces t-LAM sont également fréquemment secondaires aux AA.

La voie III contient les t-LAM présentant des translocations équilibrées impliquant le gène *MLL*, souvent de type M4 ou M5 de la classification FAB. Ces t-LAM sont secondaires aux ATII et plus particulièrement aux épipodophylotoxines. On note souvent des mutations des gènes de la voie tyrosine kinase *RAS*, *NRAS*, *KRAS* ou *BRAF*.

La voie IV comprend les t-LAM présentant des translocations équilibrées impliquant la bande 21q22 ou l'inversion du chromosome 16, aboutissant au réarrangement des gènes du CBF (*RUNX1* ou *CBFB*). Ces t-LAM sont souvent secondaires aux anthracyclines.

La voie V comprend les t-LAM de type promyélocytaire M3 avec le réarrangement du gène *RARA* en 17q21. Ces t-LAM sont souvent secondaires au traitement contenant de la mitoxantrone. Il existe fréquemment une mutation de *FLT3-ITD* comme dans les p-LAM M3.

La voie VI comprend les t-LAM avec ou sans phase pré leucémique avec un réarrangement du gène *NUP98*. Ces t-LAM sont souvent secondaires aux ATII.

La voie VII comprend les t-LAM avec un caryotype normal. Ces t-LAM ne sont pas spécifiques d'agent thérapeutique ; en revanche il est retrouvé dans les p-LAM à caryotype normal des mutations de *NPM1*, de *FLT3-ITD* et de *CEBPA*.

La voie VIII comprend des t-LAM avec ou sans phase pré leucémique avec le plus souvent une

seule anomalie chromosomique, telle que la trisomie 8 notamment. Il n'y a pas de spécificité pour l'agent mutagène impliqué.

Larson et Le Beau, quant à eux regroupent les t-LAM selon 2 groupes en fonction des profils d'expression génique dans les CD34+ des t-LAM. Les groupes A et B sont ainsi définis (tableau 5) [Larson RA, 2005].

Tableau 5 - Répartition en 2 groupes des t-LAM selon Larson et Le Beau.

Groupe A	Groupe B
Monosomie du chr. 7 et chr.5 normal	Perte du 5q et monosomie 5
Autres anomalies caryotypiques	
Sous expression des facteurs transcriptionnels <i>TALI, GAT11, EKLf</i>	Sous expression des gènes <i>ICSBP</i> et <i>APC</i>
Sur expression des gènes <i>FLT3, PI3K/PIK3L2B, BCL2</i>	Sur expression des gènes <i>CCNA2, CCNE2, CDC2, CKS2, BUB1, MYC</i>

Dans le groupe B la notion d'haploinsuffisance est relevée.

V.2. Anomalies moléculaires – les mutations

Comme on a pu le voir précédemment, les anomalies chromosomiques détectées sont de différents types (translocations réciproques, inversions, délétions, insertions, trisomies et monosomies), précisées par des techniques de FISH et de PCR, et sont présentes dans 55% de toutes les LAM [Mrozek K, 2004]. Ceci suggère que 45% des LAM restantes n'ont pas d'anomalie détectée, avec un caryotype normal. L'hétérogénéité de ce groupe à risque dit « intermédiaire » dans son pronostic, devrait s'expliquer par des anomalies microscopiques qui ne sont pas encore visibles. Cependant plusieurs mutations de gènes ont déjà été détectées. Les principales vont être énumérées dans ce sous chapitre.

V.2.1. Mutations du gène *NPM1* (*NPM1*^{mut})

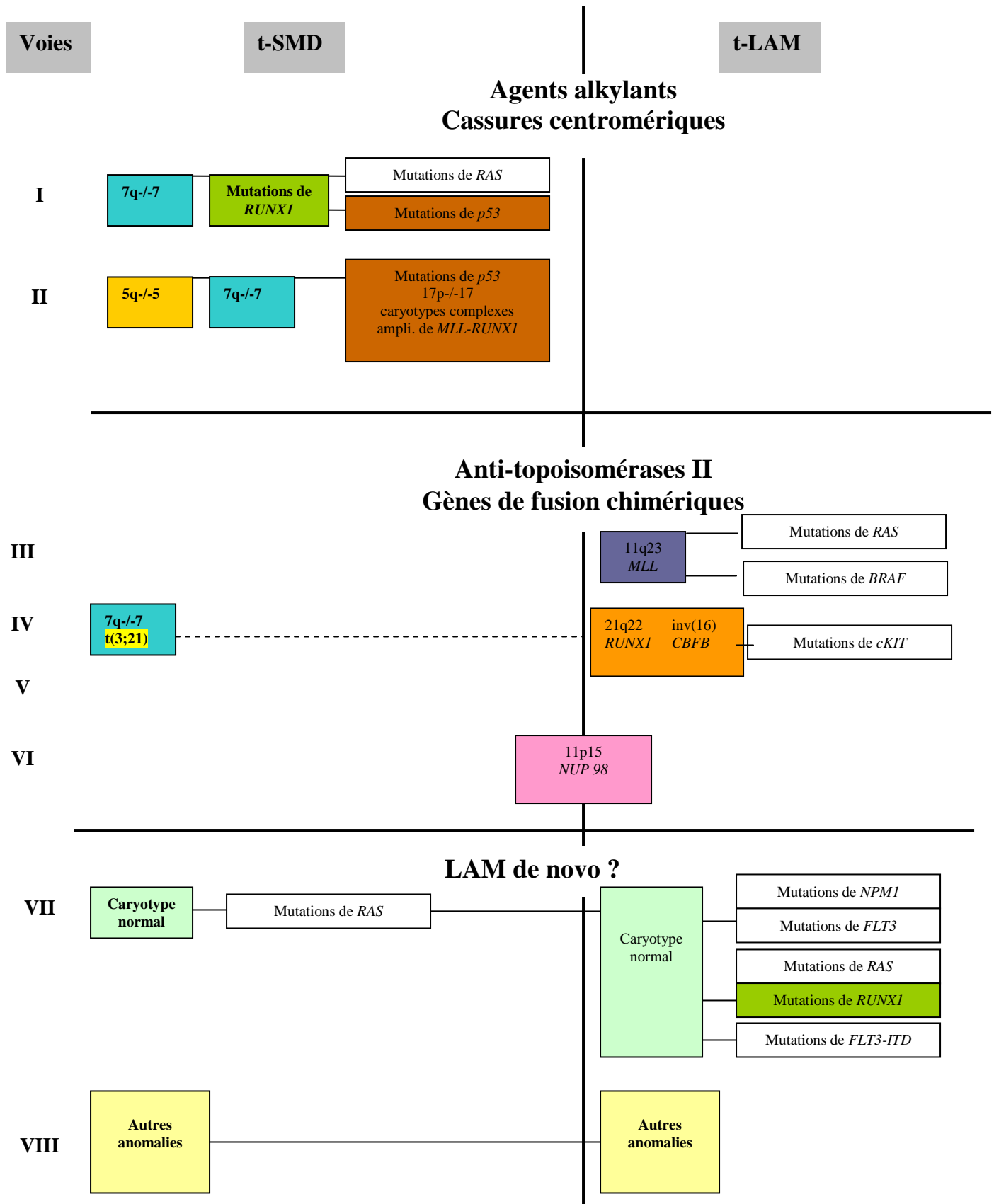
NPM1 ou Nucleophosmin 1 est situé en 5q35.1. Il est exprimé de façon ubiquitaire. La protéine fait la navette entre le noyau et le cytoplasme. Son implication est multiple avec notamment la biogenèse des ribosomes, la réponse à des situations de stress telles que l'irradiation aux UV et l'hypoxie, le maintien de la stabilité génomique, la régulation et la stabilité de gènes suppresseur de tumeurs comme *TP53* et *ARF* et la régulation transcriptionnelle. C'est l'équipe de Falini [Falini B, 2005] qui a mis en évidence la présence anormale intracytoplasmique de *NPM1* liée à des mutations sur l'exon 12 du gène.

On détecte ces mutations dans 45% à 62% des LAM à caryotype normal [Falini B, 2005].

Ce que l'on observe également c'est l'association de *NPM1*^{mut}, dans environ 40% des LAM à caryotype normal, à la mutation *FLT3*-ITD (voir plus bas). Ce qui est intéressant en terme pronostique ce sont les LAM présentant une *NPM1*^{mut} et l'absence de *FLT3*-ITD : celles-ci ont un pronostic bien meilleur [Döhner K, 2005 ; Verhaak RG, 2005 ; Schnitter S, 2005 ; Thiede C, 2006].

On notera que les travaux de Kayser en 2011 [Kayser S, 2011] ont montré une fréquence moindre dans les t-LAM (16% versus 30% dans les p-LAM).

Figure 2 - Huit voies génétiques alternatives dans les t-LAM proposées par Pedersen-Bjergaard et al.



D'après Pedersen-Bjergaard J, et al. Leukemia, 2006, 20(11), 1943-1949

V.2.2. Mutations du gène *FLT3*

FLT3 ou Fms like tyrosine kinase 3 est situé en 13q12. C'est un membre de la famille des récepteurs tyrosine kinase de classe III exprimé à la surface des cellules progénitrices hématopoïétiques. *FLT3* et son ligand joue un rôle important dans la prolifération, la survie et la différenciation des cellules souches.

Les mutations retrouvées dans les LAM provoquent l'activation de *FLT3* selon deux mécanismes. Des mutations vont toucher le domaine juxtamembranaire (JM) et activent le domaine tyrosine kinase (TDK). On parle de mutations *FLT3*-ITD (Internal Tandem Duplication) lorsqu'elles sont localisées dans les exons 14 et 15 du gène. Les mutations touchant la boucle C-terminale du TDK sont appelées *FLT3*-TDK et sont de type ponctuel avec de petites insertions/délétions.

Le pronostic des LAM avec une mutation de *FLT3* est moins bon que les LAM sans cette anomalie [Kottaridis PD, 2001 ; Fröhling S, 2002 ; Thiede C, 2002].

De même l'équipe de Kayser [Kayser S, 2011] a trouvé moitié moins de mutations *FLT3*-ITD dans les t-LAM.

Ces fréquences moindres ont été également rapportées par une équipe de Hong Kong en 2004 [Au WY, 2004].

V.2.3. Mutations du gène *CEBPA*

CEBPA ou CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha est situé en 19q13.1. C'est un facteur de transcription qui joue un rôle clef dans l'orientation des progéniteurs myéloïdes vers leur différenciation en polynucléaires neutrophiles.

On distingue 2 types de mutations. Les mutations de type non sens de la région N-terminale permettant de réguler positivement une isoforme tronquée ayant des propriétés négatives. L'autre type de mutation atteint la partie C-terminale de la molécule par un déplacement du cadre de lecture altérant la capacité à se lier à l'ADN.

On relève que les LAM à caryotype normal avec une mutation de *CEBPA* ont un meilleur pronostic [Preudhomme C, 2002 ; Fröhling S, 2004]

V.2.4 Mutation en Partial Tandem Duplication PTD du gène *MLL*

La mutation PTD de *MLL* est retrouvée dans 5 à 11% des LAM à caryotype normal. Il s'agit d'une duplication de la portion interne du gène allant le plus souvent de l'exon 2 à l'exon 6 ou de l'exon 2 à l'exon 8. On aboutit à la fusion des segments dupliqués décalant le cadre de lecture empêchant l'allèle wild-type de s'exprimer. Le pronostic est plutôt mauvais [Schnittger S, 2000 ; Döhner K, 2002].

V.2.5 Mutations du gène *NRAS*

NRAS ou Neuroblastoma RAS (v-ras) oncogène est situé en 1p13.2. Il fait partie de la famille des oncogènes *RAS* qui ont une activité GTPase. Ce sont des régulateurs de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose. La plupart des mutations est

localisée dans les exons 12, 13 et 61 du gène conduisant à l'activation constitutive de la protéine RAS via le GTP qui reste dans son état lié.

Il ne semble pas pour l'instant que ces mutations aient un impact pronostique [Bowen DT, 2005]

V.2.6. Mutations du gène WT1

WT1 ou Wilms tumor 1 est situé en 11p13. C'est un facteur transcriptionnel. Il a été montré qu'il commande le statut de quiescence des progéniteurs hématopoïétiques mais aussi leur passage à l'état différencié en cellules myélomonocytaires [Ellisen LW, 2001]. Les mutations représentent 10% des LAM à caryotype normal [Summers K, 2007]. Ce sont des insertions/délétions situées sur les exons 7 et 9 du gène. Le pronostic de ces mutations n'est pas encore bien connu.

V.2.7. Mutations des gènes IDH1 et IDH2

IDH1 ou Isocitrate dehydrogenase 1 est situé en 2q33.3 son isoforme mitochondriale est l'*IDH2* située en 15q26.1.

IDH1 et *IDH2* ont des activités oxydatives. La mutation concernant *IDH1* se situe sur le codon 132 (mutation *IDH1*^{R132}) [Wagner K, 2010 ; Marcucci G, 2010 ; Ho PA, 2010]. On trouve la mutation *IDH2*^{R172} pour le gène *IDH2* [Marcucci G, J Clin Oncol, 2010 ; Ward PS, 2010].

Une étude récente [Patel KP, 2011] montre que *IDH1*^{R132} est présent dans 6% des LAM et *IDH2*^{R172} dans 2%, la plupart des LAM ayant un caryotype normal. Une étude un peu plus antérieure [Boissel N, 2010] retrouvait ces mutations dans les mêmes proportions. Aucune des mutations des *IDH1* ou *IDH2* n'a été retrouvée associée aux autres mutations connues.

Dans tous les cas ces mutations sont de mauvais pronostic.

V.2.8. Mutations des gènes RUNX1 et TET2

Elles font un des objets de la discussion et seront donc développées dans ce chapitre.

V.2.9. Comparaison entre les t-LAM et les LAM du sujet âgé

Un travail de synthèse de 2011 [F. D'Aló, 2011] permet de comparer les LAM des sujets âgés (de 60 ans et plus) aux t-LAM. On arrive à deux types de conclusions. Le premier est qu'il existe des similitudes entre ces deux groupes de leucémies. Elles concernent les t-LAM post AA ou post radiothérapie : phase myélodysplasique pré-leucémique, anomalies portant sur les chromosomes 5 et 7, caryotype complexe et monosomal.

Le second est l'existence de différences essentiellement sur un plan moléculaire : mutation de *RUNX1* ou de *TET2* par exemple. Le tableau C reprend l'essentiel du tableau rédigé par les auteurs de cet article.

Dans ce même article, les t-LAM sont divisées en deux groupes en fonction de l'expression de certains gènes. La première catégorie regroupe les t-LAM présentant -5/5q- avec une hyperexpression de certains gènes intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire (*CCNA2*, *CCNE2*, *CDC2*, *BUB1*) et dans la croissance (*MYC*) et une sous expression de *ICSBP*. La seconde catégorie comprend les t-LAM où *FLT3* et *BCL2* sont surexprimés alors que *TALI*, *GATA1* et *EKLF* (facteurs transcriptionnels intervenant au début de l'hématopoïèse) sont sous exprimés.

Tableau C– Similitudes, en comparaison avec les p-LAM, entre les t-LAM et les LAM du sujet âgé

Similitudes	t-LAM	LAM du sujet âgé
Aspect clinique et cytologique	Pré-phase myélodysplasique et leucopénie	Pré-phase myélodysplasique et leucopénie
Cytogénétiques	Anomalies fréquentes (caryotype présentant -5/5q-, -7/7q-, complexité, caryotype monosomal)	Anomalies fréquentes (caryotype présentant -5/5q-, -7/7q-, complexité, caryotype monosomal)
Moléculaires	Fréquence diminuée des mutations de <i>FLT3</i> , <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>TET2</i>	Fréquence augmentée des mutations de <i>FLT3</i> , <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>TET2</i>
	Pas de données pour la fréquence des mutations de <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	Fréquence augmentée des mutations de <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>
	Fréquence augmentée des mutations de <i>RUNX1</i>	Pas de différence de la fréquence des mutations de <i>RUNX1</i>
	Pas de différence de la fréquence de mutation de <i>NRAS</i>	Pas de différence de la fréquence de mutation de <i>NRAS</i>

D'après Francesco D'Alò, Luana Fianchi, Emiliano Fabiani et al, Mediterr J Hematol Infect Dis 2011.

VI. SUSCEPTIBILITE CONSTITUTIONNELLE AUX t-LAM

Tous les patients traités par chimio et/ou radiothérapie ne développent pas une t-LAM. Ainsi il faut envisager qu'il existe des facteurs particuliers entraînant cette complication qui survient à moyen ou long terme.

Ce qui est fortement envisagé à l'heure actuelle est la prédisposition aux t-LAM liées au polymorphisme des enzymes intervenant dans la réparation de l'ADN et celles du métabolisme des médicaments.

VI.1. Polymorphisme des gènes de réparation de l'ADN [Guillem V, 2008]

Il existe plusieurs polymorphismes des gènes de réparation de l'ADN associés aux risques de développer une t-LAM. Ce polymorphisme est présent dans tous les mécanismes connus (BER, NER, MMR et RH).

VI.1.1. Dans le système RH (Recombinaison Homologue)

Les gènes impliqués sont *RAD51* et *XRCC3*. Ces 2 gènes sont considérés comme indispensables au maintien de la stabilité génomique [Sonoda E, 1998 ; Tebbs RS, 1995]. La protéine Rad51 transporte l'ADN et génère les réactions ATP dépendante pour appairer les

doubles brins homologues [Baumann P, 1996]. XRCC3 interagit ensuite avec Rad51 [Bishop DK, 1998].

Il a été rapporté que les polymorphismes de *RAD51* (*RAD51-G135C*) et de *XRCC3* (*XRCC3-Thr241Met*) sont impliqués dans le risque de développer une p-LAM et une t-LAM, surtout si les allèles *RAD51C* et *XRCC3Met* sont présents ensemble dans le génome [Seedhouse C, 2004].

VI.1.2. Dans le système BER (Base Excision Repair)

La stabilité génomique dans ce système repose sur le gène *XRCC1*. Ce gène est impliqué dans la réparation de l'ADN après exposition aux AA [Brem R, 2005]. La substitution de l'arginine par la glutamine dans l'exon 10 du gène *XRCC1* semble augmenter le risque de développer une t-LAM [Seedhouse, 2002].

VI.1.3. Dans le système NER (Nucleotide Excision Repair)

XPD code une protéine ayant une fonction hélicase qui sert d'intermédiaire dans le débobinage de l'ADN lors de la transcription et de l'excision nucléotidique. Ce gène intervient lors des dégâts infligés à l'ADN par les AA. Au codon 751, le remplacement de la lysine par la glutamine augmente également le risque de développer une t-LAM [Allan JM, 2004] et peut être même, les t-LAM présentant la délétion du bras long du chromosome 5 et/ou 7 [Smith AG, 2007].

VI.1.4. Dans le système MMR (MisMatch Repair)

MSH2 est un gène impliqué dans le système MMR en intervenant en post-réplication. Une équipe [Worrillow LJ, 2003] rapporte que chez les patients traités par cyclophosphamide et procarbazine développant une t-LAM, le polymorphisme avec l'allèle variant (C) *hMSH2* est très représenté avec un grand risque de MSI (Micro Satellite Instability). Cette MSI peut de plus survenir sur les gènes *RAD51* et *BCR2* [Worrillow LJ, 2006].

VI.2. Polymorphisme des gènes de détoxification

Le métabolisme des agents génotoxiques et donc des produits de chimiothérapie peut être divisé en 2 phases. La phase I implique l'activation de substrats en intermédiaires électrophiles, grâce principalement à la famille enzymatique du cytochrome p450 (CYP). Les produits obtenus par les réactions catalysées via le CYP sont très réactifs et peuvent être responsables de dommages intra cellulaires et notamment endommager l'ADN.

La phase II (conjugaison) fonctionne avec des enzymes qui inactivent les substrats génotoxiques (provenant ou non de la phase I). Les molécules intervenant dans cette phase sont la famille des glutathione S-transférases (GST) et des N-acétyltransférases (NAT) telle que la NAD(P)H:quinone oxidoréductase 1 (NQO1).

L'équilibre entre ces 2 phases est capital pour la réponse cellulaire aux xénobiotiques.

Un très grand nombre de polymorphismes a été trouvé parmi les gènes de détoxification. Certains de ces polymorphismes aboutissent en une protéine défailante. Quelques uns ont été étudiés dans les t-LAM.

VI.2.1. Cytochrome p450 (CYP)

Les substrats xénobiotiques du CYP sont aussi bien, par exemple, des hydrocarbures polycycliques, que des médicaments anticancéreux. Le système CYP transfère une molécule d'oxygène sur le substrat créant une molécule intermédiaire hautement réactive qui, si elle n'est pas prise en charge par la phase II de détoxification devient très toxique pour l'ADN [Park JY, 1996]. Le polymorphisme et les différents niveaux d'activité des enzymes médiés par leurs inhibiteurs et inducteurs sont responsables d'une grande variabilité d'expression de l'ensemble de ces enzymes.

Bien qu'il y ait un grand nombre de polymorphisme, seulement quelques uns ont été étudiés parmi les cas de t-LAM [Seedhouse C, 2007]. L'auteur en relève 13. En outre, aucune conclusion ne peut être aisément portée car les résultats sont dans l'ensemble peu significatifs et laissent suggérer plusieurs hypothèses qui sont sans réponse. Un médicament n'est pas catalysé par une seule isoenzyme dans le système, il existe une synergie qui n'explique pas si elle favorise l'augmentation ou la réduction du risque de développer une t-LAM. A l'inverse, si les cellules restent viables, celles-ci devraient contenir une concentration élevée d'ADN lésé et augmenter le risque de développer une t-LAM. Pour répondre à cette dernière question, le nombre de cas étudiés doit être plus grand [Seedhouse C, 2007].

VI.2.2. Conjugaison (phase II)

Glutathione S transférase GST

Les GSTs sont une famille multigénique d'isoenzymes. Elles hydrolysent les électrophiles réactifs via la conjugaison afin de réduire le glutathion et ainsi prévenir les dommages de l'ADN. Le polymorphisme porte sur trois des sous familles de GSTs : GSTM (μ), GSTP (π), GSTT (θ). Ces trois dernières détoxifient notamment des mutagènes environnementaux et de nombreux médicaments anticancéreux [Hayes JD, 1995].

Ici encore Seedhouse reste très critique quant à l'implication significative de ces polymorphismes dans les t-LAM [Seedhouse C, 2007]. Cependant il existe plusieurs articles qui font le constat de l'existence de différents types de cancers qui pourraient être associés avec GSTT1 [Skjelbred CF, 2007; Sreeja L, 2008 ; Suzen HS, 2007].

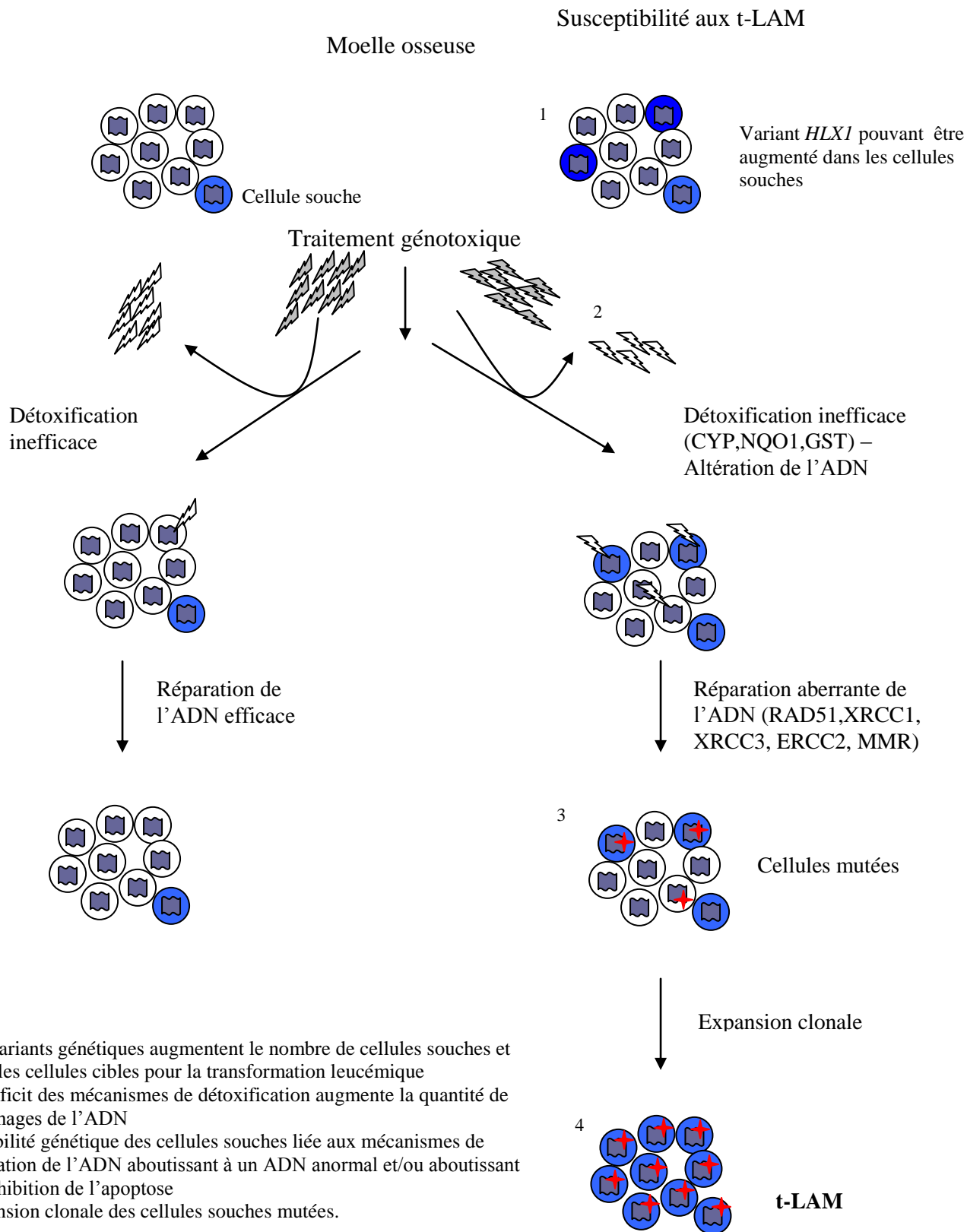
NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 NQO1

NQO1 est une flavoenzyme intracytoplasmique qui a un rôle capital dans la protection de la cellule contre des éléments endogènes et exogènes contenant des quinones et leurs dérivés métaboliques. La réduction de ces substrats utilise les cofacteurs NADP ou NADPH pour catalyser les substrats : ainsi, il y a moins d'hydroquinones produits dans la cellule.

NQO1 prévient la génération de molécules oxygénées et de radicaux libres qui peuvent conduire à des dommages oxydatifs de différents éléments cellulaires [Seedhouse C, 2007]. Il semblerait que certains polymorphismes pourraient être impliqués dans une susceptibilité plus grande de développer une t-LAM, notamment à l'état homozygote pour NQO1-187Ser [Larson RA, 1999 ; Naoe T, 2000].

La figure 3 résume l'ensemble des points évoqués ci-dessus.

Figure 3 - Mécanismes possibles de susceptibilité aux t-LAM



- (1) Les variants génétiques augmentent le nombre de cellules souches et ainsi les cellules cibles pour la transformation leucémique
- (2) Le déficit des mécanismes de détoxification augmente la quantité de dommages de l'ADN
- (3) Instabilité génétique des cellules souches liée aux mécanismes de réparation de l'ADN aboutissant à un ADN anormal et/ou aboutissant à l'inhibition de l'apoptose
- (4) Expansion clonale des cellules souches mutées.

VII PRINCIPES DE LA CGH ARRAY

Le caryotype morphologique classique questionne la totalité du génome. Les chromosomes sont étudiés cellule par cellule au stade de métaphase. Idéalement, on observe 20 métaphases pour rechercher une anomalie et de savoir si elle est homogène. L'anomalie clonale peut être de nombre, de structure, d'échange de matériel équilibré ou non. C'est un examen consommateur de temps et peu automatisable. Son niveau de résolution est limité de l'ordre de 4 à 5 mégabases (Mb) et des anomalies cryptiques, non décelables par les bandes, sont courantes.

La technique de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) peut être utilisée à toutes les étapes du cycle cellulaire. Elle est complémentaire du caryotype. La mise en évidence de remaniement chromosomique passe donc en dessous de 4 Mb. La mesure du nombre de copies d'une séquence du génome humain est fiable permettant le diagnostic de monosomies ou de trisomies dans des noyaux interphasiques complets. Les translocations sont efficacement visualisées par cette technique. Cependant, il faut disposer des sondes adéquates. Sans orientation clinique ou cytogénétique préalable, la FISH est peu informative. C'est une technique ciblée.

La Comparative Genomic Hybridization (CGH) est mise au point en 1992 [Kallioniemi A, 1992] par l'équipe de D. Pinkel. C'est une technique de cytogénétique pan génomique qui consiste à co-hybridiser la même quantité d'ADN contrôle et d'ADN du malade sur les chromosomes d'un sujet normal. Ces sondes d'ADN sont marquées chacun par un fluorochrome différent. Par la suite, une numérisation des signaux générés par les fluorochromes est effectuée. L'intensité de chaque signal sur les bandes chromosomiques est le reflet du rapport entre l'hybridation des sondes d'ADN témoins et celle des sondes de l'ADN pathologique. Son niveau de résolution est de l'ordre de 5 à 10 Mb.

Six ans plus tard cette même équipe [Pinkel D, 1998] améliore cette technique en utilisant des lames sur lesquelles sont posés des milliers de fragments d'ADN ou oligonucléotides en spots homogènes : c'est l'array CGH. La plupart des micro-matrices d'ADN utilisent désormais des oligonucléotides de 20 à 60 bases, environ qui sont synthétisés in situ. Selon la fréquence d'échantillonnage, la résolution est plus ou moins grande. Jusqu'en 2007 des BACs étaient surtout utilisés (3000 à 6000 spots). Des micro-matrices pangénome, disponibles dans le commerce, comprennent de l'ordre de 100 000 à 1 000 000 de spots (et au delà), et offrent une résolution d'1 Mb [Redon R, 2006]. Ainsi la CGH permet de quantifier l'ADN tumoral en tout point des chromosomes au cours de la même analyse.

Il existe 2 types de fabrication de puces selon la méthode de synthèse des oligonucléotides sur les lames de verre:

- par photolithographie (société Affimetrix[®]) déposant des oligonucléotides de 25 mers environ
- par impression en jet d'encre (société Agilent[®]) déposant des oligonucléotides de 50 mers environ

Les oligonucléotides sont répartis sur l'ensemble de la puce et sont de taille de quelques dizaines de mers. Le niveau de résolution de ces puces n'a cessé de s'élever permettant d'atteindre une résolution de quelques kilobases. Des micro-matrices d'oligonucléotides sont désormais disponibles, avec la possibilité de corréler les données CGH avec celle du transcriptome. Les séquences d'oligonucléotides sont répétées (réplicats et triplicats) et dispersées in situ sur la surface d'une lame en verre (on parle de face active). La technique de la CGH sur micro-matrices ou CGH array (ou aCGH) a déjà permis de discerner plusieurs zones amplifiées dans un amplicon qui apparaissait unique, et de voir des petites duplications ou délétions chromosomiques.

Cette technique très performante permet de détecter les variations du nombre de copies d'ADN appelées CNA (Copy Number Abnormalities) telles que les amplifications et les délétions de régions chromosomiques associées à des pathologies du développement ou à des cancers, en tout point du génome (sous réserve d'une densité suffisante en matériel tumoral > 50% de cellules pathologiques dans le tissu). Les chromosomes peuvent être considérés comme des « micropuces » naturelles avec un très haut niveau d'intégration.

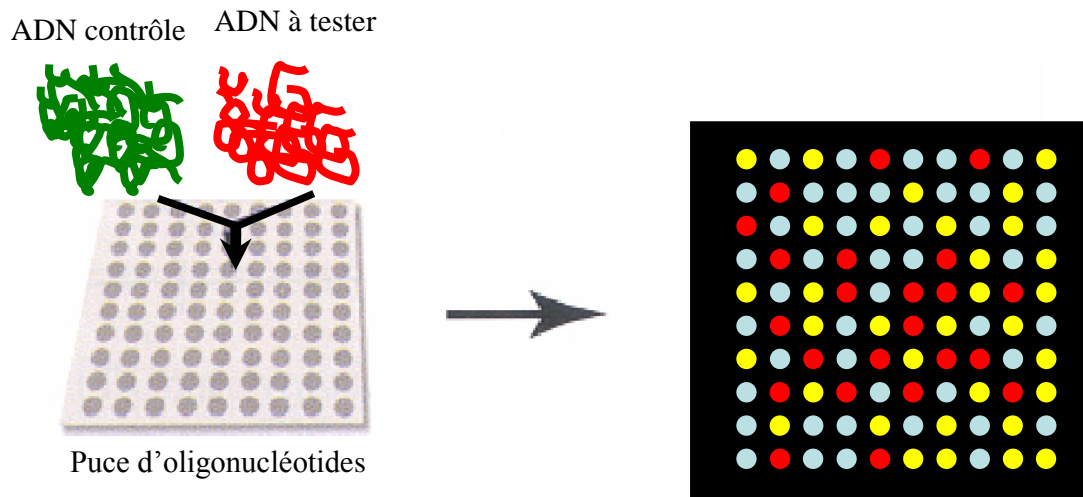
Les polymorphismes physiologiques (duplications fréquentes dans le génome entre autres, (Copy Number Variation, CNV) sont visibles par une aCGH à très haute résolution telles que celles utilisées dans ce projet (244 K soit près de 244 000 oligonucléotides et 400 K soit une lame contenant 400 000 oligonucléotides en deux exemplaires pour le traitement simultané de 2 patients différents). (Voir figure 4).

Ces outils toujours plus performants ont générés de nouveaux travaux pour la détection d'anomalies cryptiques dans les LAM et les SMD. En utilisant la CGH, des gains ou des pertes chromosomiques de 5 à 10 Mb ont été détectées. [Kim MH, 2001; Casas S, 2004; Gross M, 2009]. Ces résultats ont été affinés et améliorés en utilisant la CGH array permettant de détecter des CNA de moins de 5 Mb [Martinez-Ramirez A, 2003].

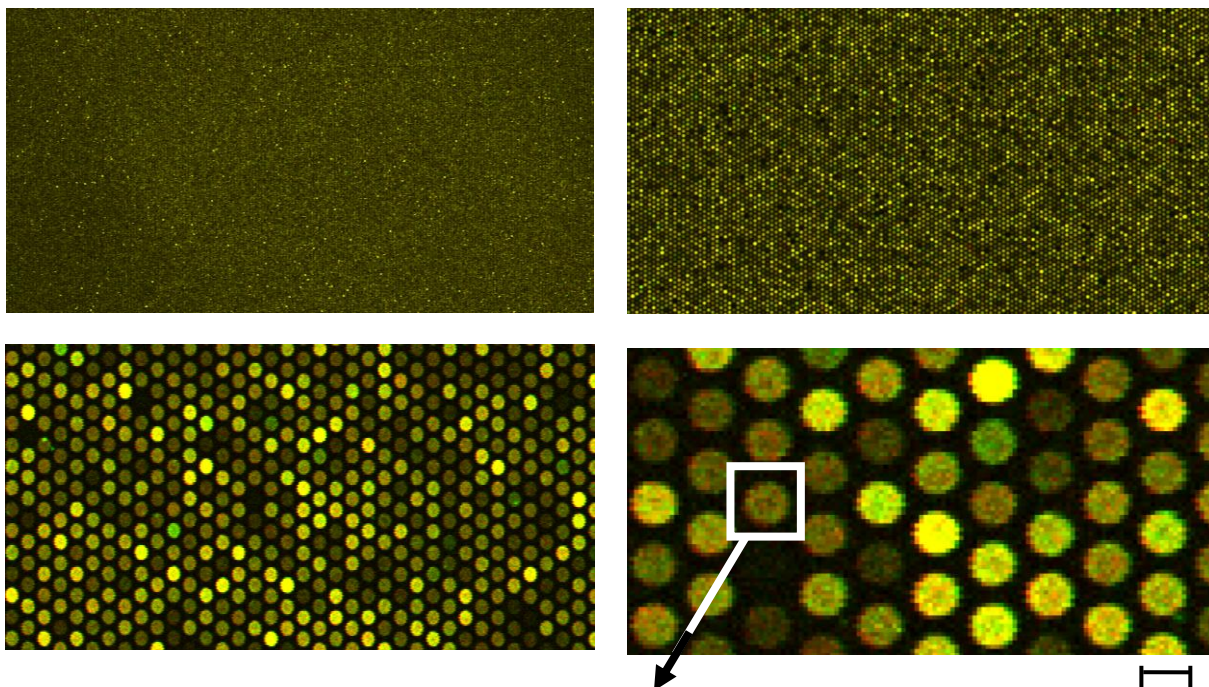
De plus, le développement d'algorithmes de bioinformatique de plus en plus performants, permettent l'utilisation de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) array pour rechercher des CNA et d'identifier des LOH (Loss Of Heterozygosity, perte de l'hétérozygotie). La perte d'un allèle laisse l'autre allèle hemizygoté ou homozygoté selon le mécanisme de perte. Dans les deux cas il s'agit d'une perte d'hétérozygotie. En répétant ce test tout le long du génome on peut détecter des pertes d'hétérozygotie de tailles extrêmement variées. On observe des LOH sans anomalie du nombre de copie : on parle alors de CN-LOH (Copy Neutral LOH). Les premières observations, dans un cadre constitutionnel, impliquaient des chromosomes entiers et ont été dénommés UPD (Uni Parental Disomy). Il s'agissait de mal-ségrégations avec perte d'un chromosome suivi d'une duplication de l'autre, ou vice versa, très précoces. Puis on a constaté l'existence d'UPD segmentaires qui ne pouvait s'expliquer que par recombinaison équilibrée entre les deux chromosomes homologues. Dans les cellules malignes on a pendant longtemps recherché des LOH ciblées puis l'on a utilisé les SNP. On a observé de nombreuses UPD complètes ou segmentaires. Beaucoup ont été reliées à des pertes de nombre de copies par les techniques classiques mais aussi par utilisation des SNP pour l'évaluation du nombre de copies [Heinrichs S, Blood, 2010]. On observe des UPD dans les LAM à caryotype normal [Gorletta TA, 2005]. Dans son travail Parkin retrouve au sein des pertes environ 9% d'UPD parmi différents types de LAM (t-LAM comprises) [Parkin B, 2010].

Comme on le verra dans le développement de la thèse, la CGH array et le SNP array ont identifié dans les LAM un panel récurrent de CNA [Eklund EA, 2010].

Figure 4 - Principes de la CGH array



La co-hybridation est effectuée sur une lame sur laquelle ont été fixés des milliers de fragments d'ADN génomique ou spot d'oligonucléotides. L'acquisition et l'analyse sont réalisées au niveau de chaque dépôt d'ADN



12x12 pixels en rouge pour les pertes et en vert pour les gains

VIII. OBJECTIFS DU PRESENT TRAVAIL

Les t-LAM peuvent ainsi être considérées comme un modèle de LAM induite in vivo. Le but du présent travail est de mettre en évidence des anomalies cryptiques infracytogénétiques par aCGH de haute résolution, dans les t-LAM et dans les p-LAM, utilisées comme contrôles, de les comparer et de trouver des régions minimales critiques susceptibles de contenir des gènes candidats de la leucémogénèse, en particulier induite. A terme, des travaux fonctionnels sur certains de ces gènes pourraient confirmer que ces gènes pourraient être des cibles thérapeutiques qui pourraient être différentes selon le groupe de leucémies, induites ou primaires.

Ce travail sera poursuivi par l'étude du transcriptome et du miRNome pour conforter ou non les résultats en aCGH. Comme on le verra, ce projet est actuellement porté par une faible quantité de patients et ne permettra pas dans l'immédiat d'apporter une conclusion.

MATERIELS ET METHODE

I. POUR L'ETUDE PAR aCGH 244K et 2x400K

I.1. Patients atteints d'une t-LAM

A partir d'une analyse cytogénétique par caryotype et/ou FISH (sur moelle osseuse ou sur du sang), une soixantaine de patients porteurs d'une leucémie secondaire dont l'envahissement médullaire ou la blastose sanguine était $\geq 60\%$, ont été enregistrés dans le laboratoire de cytogénétique de l'Institut Gustave Roussy entre 1995 et 2006. Ces patients n'étaient pas traités pour leur leucémie au moment du prélèvement.

Le Centre de Ressource Biologique (CRB) de l'IGR avait à disposition 30 échantillons congelés dans l'azote liquide.

Les tableaux 6 et 7 résument les caractéristiques de ces leucémies ainsi que leurs résultats cytogénétiques et quelques cas de myélodysplasies induites.

On compte dans la population pour l'étude en 244K, 8 cancers du sein, 7 lymphomes (non hodgkiniens et hodgkiniens), 3 cancers ovariens et 12 autres types de cancer (prostatique, endométrial, vésical, sarcomateux, de la sphère ORL et un myélome).

La deuxième série pour l'étude en 2x400K apporte 6 nouveaux cas de t-LAM. On note un cas (t-jal) présentant une seconde t-LAM.

I.2. Patients atteints d'une p-LAM

Trente six p-LAM ont été choisies et étudiées en 244K. La deuxième série pour l'analyse en 2x400K comprend 13 sujets. Leurs caractéristiques sont rapportées dans les tableaux 8 et 9.

I.3. Description des étapes depuis la décongélation jusqu'à l'utilisation des puces Agilent

Chacune de ces étapes est résumée dans l'article de *Itzhar N. et al, 2011* (voir la rubrique Annexe)

Tableau 6 – Patients présentant une t-LAM, étudiés par aCGH 244K: aspects clinique, biologique et cytogénétique

P	Age/sexe	Cancer initial	Traitements	FAB	Caryotype au diagnostic de t-LAM	FISH	Type de LAM induite
t-1	71/F	Carcinome ovarien	Tax/SP/PSC833/Iressa	AREB	57,XX,+1,+4,del(5)(q15;q33)x2,-7,+8,+9,+13,+14,-17,+18,+19,+20,+22,+mar[4]	MLL WT	A
t-2	67/F	Lymphome à lymphocytes villeux	Fluda/Chlorambucil	LAM 5	44,XX,del(5)(q),-7,-12,-14,-18,+der(12 ?),+mar[20]	MLL WT	A
t-3	44/F	Liposarcome mammaire	Alk/ATII	LAM 0	46,XX,der(1),t(1 ;17)(p36;?),der(7),t(7;?)(p15;?),der(10)(7;10;17)(?;p11 ;q21 ?),der(17)(q11 ?),ins(17 ?)[11]	MLL NF	I
t-4	45/F	LNH T cutané	RT/BCNU/Alk/ATII/Autogreffe	LAM 0	45,XX,dup(2)(q22;q34),-3p21,t(5;13)(p15;q14),t(6;8)(p21;q24),+i(7q),der(7)t(7 ;15)(q10;q10),der(12)t(12;17)(p13;q11),-15,-17[18]	MLL WT	I
t-5	72/M	Carcinome œsophagien	5FU/SP/RT/curiethérapie	AREB	45,XY,add(1)(q41),-5,-7,+mar[11] / 45,XY,add(1)(q41),-5,-7, t(12;20?)(p12;q12)+mar[11]	MLL NF	A
t-6	44/M	LNH folliculaire	ATII/Alk/oncovin Alk/ATII/TBI/Alk Fluda	LAM	46,del(X)(q23),Y,der?(6),t(2;6)(q12;q21),-7,del(18 ?)(q12),add(20)(q12) ; conclusion rendue sans certitude	MLL NF	A
t-7	73/M	Myélome	Alk/CS/INF/ATII/BCNU	LAM*	46-47,XY,-7,+8,+r,+dm[20]	MLL NF	A
t-8	72/M	LNH folliculaire	Alk/ATII/Fluda/ Chlorambucil/ Rituximab/RT splénique	LAM 5	47,XY,del(7)(q21q32),+13[11]	MLL NF	A
t-9	69/M	Cancer ORL	RT	LAM 5	45,XY,-7[12]	MLL WT	A
t-10	57/M	Cancer vésical	RT/SP	SMD	46,XY[14]/46-47,XY,del(7)(q)[5]	MLL NF WCP 7	A
t-11	62/M	LNH folliculaire	Alk/ATII/INF/MethylGAG Rituximab/RT cutanée	LAM 5	Non disponible	MLL NF	A

Tableau 6 – Suite

P	Age/sexe	Cancer initial	Traitements	FAB	Caryotype au diagnostic de t-LAM	FISH	Type de LAM induite
t-12	63/M	CBNAP	ATII/SP/RT	LAM	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[1]/ 46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(7)(q11q34)[13]	MLL NF	I
t-13	38/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT/AM	LAM	46,XX,add(1)(q3 ?)[25]	MLL NF	I
t-14	25/F	Cancer de l'endomètre	Alk/ATII/SP/Actinomycine	LAM 4	47,XX,+8[14]	MLL WT	I
t-15	52/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT	LA biphéno	48,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),+17[12]	MLL NF WCP8+ WCP17- Bcr-Abl fus	I
t-16	46/F	Cancer mammaire	RT	LAM 2	46,XX,inv(16)(p13;q22)[16]	MLL NF	T
t-17	38/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT	LAM 3	Pas de métaphase	PML- RARA fus	T
t-18	57/F	LNH T	Alk/ATII/Bléo/ATII ATII/Alk	LAM 3	46,XX,t(1;17)(q2;q21)[10]	PML- RARA fus	T
t-19	55/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT/HT/Tax	LAM 5	46,XX,t(9;11)(p21;q23)[21]	MLL NF	T
t-20	61/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT/HT	LAM 5	46,XX,t(9;11)(p21;q23)[14]	MLL rem	T
t-21	60/F	LNH	Alk/ATII/Autogreffe	LAM 5	46,XX,t(9;11)(p21;q23)[12]	MLL rem	T
t-22	19/M	Ostéosarcome	Alk/ATII/SP	LAM 5	46,XY,t(9;11)(p21;q23)[8]/ 46,XY,t(9;11)(p21;q23),+8[10]	MLL rem	T
t-23	22/F	LH	Alk/ATII/Bléo/Oncovin	LAM 5	46,XX,t(9;11)(p21;q23)[12]	MLL rem	T

Tableau 6 – Suite

P	Age/sexe	Cancer initial	Traitements	FAB	Caryotype au diagnostic de t-LAM	FISH	Type de LAM induite
t-12	63/M	CBNAP	ATII/SP/RT	LAM	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[1]/ 46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(7)(q11q34)[13]	MLL NF	I
t-13	38/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT/AM	LAM	46,XX,add(1)(q3 ?)[25]	MLL NF	I
t-14	25/F	Cancer de l'endomètre	Alk/ATII/SP/Actinomycine	LAM 4	47,XX,+8[14]	MLL WT	I
t-15	52/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT	LA biphéno	48,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),+17[12]	MLL NF WCP8+ WCP17- Bcr-Abl fus	I
t-16	46/F	Cancer mammaire	RT	LAM 2	46,XX,inv(16)(p13;q22)[20]	MLL NF	T
t-17	38/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT	LAM 3	Pas de métaphase	PML- RARA fus	T
t-18	57/F	LNH T	Alk/ATII/Bléo/ATII ATII/Alk	LAM 3	46,XX,t(1;17)(q2;q21)[10]	PML- RARA fus	T
t-19	55/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT/HT/Tax	LAM 5	46,XX,t(9;11)(p21;q23)[21]	MLL NF	T
t-20	61/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT/HT	LAM 5	46,XX,t(9;11)(p21;q23)[14]	MLL rem	T
t-21	60/F	LNH	Alk/ATII/Autogreffe	LAM 5	46,XX,t(9;11)(p21;q23)[12]	MLL rem	T
t-22	19/M	Ostéosarcome	Alk/ATII/SP	LAM 5	46,XY,t(9;11)(p21;q23)[8]/ 46,XY,t(9;11)(p21;q23),+8[10]	MLL rem	T
t-23	22/F	LH	Alk/ATII/Bléo/Oncovin	LAM 5	46,XX,t(9;11)(p21;q23)[12]	MLL rem	T

Tableau 6 –Suite

P	Age¹/sexe	Cancer initial	Traitements²	FAB	Caryotype au diagnostic de t-LAM	FISH	Type de LAM induite
t-24	44/F	Carcinome ovarien	Tax/ATII/SP/Iressa	LA Biphéno	46,XX[2]	MLL rem	T
t-25	64/F	Carcinome ovarien	Tax/SP/Iressa	SMD	46,XX[17]	MLL WT	I
t-26	51/F	Cancer anal Cancer mammaire	RT Alk/ATII/RT	LAM	46,XX[5]	MLL WT	I
t-27	47/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT/HT	LAM 2	46,XX[20]	MLL WT	I
t-28	54/F	Cancer mammaire	Alk/ATII/RT	LAM 1	46,XX[16]	MLL WT	I
t-29	71/M	Cancer prostatique	RT	LAM	46,XY[20]	MLL WT	I
t-30	67/M	Cancer ORL	ATII/SP/Bléo/RT	LAM 5	46,XY[21]	MLL WT	I

Légende :

1= age au moment du diagnostic de t-LAM ; **2=**Traitement du cancer primaire ;

P= patients ; **Alk** =alkylant; **RT**=radiothérapie; **AT II**=antitopoisomérase II; **AM**=antimétabolite; **Tax**=taxane; **Fluda**=fludarabine; **SP**= sels de platine; **LNH**= lymphome non hodgkinien; **Bléo**=bléomycine; **HT**=hormonothérapie; **LH**= lymphome de Hodgkin; **INF**=interferon; **curie**=curiethérapie; **TBI**=Total Body Irradiation; **Oncov**=oncovin

A = t-LAM de type post alkylant; **T**= t-LAM de type post antitopoisomérase II ; **I**= t-LAM induite post agent indéterminé

MLL WT = MLL Wild Type; **MLL Rem**= MLL remanié, **NF** = Non fait

Tableau 7 - Patients présentant une t-LAM pour l'analyse par aCGH 2x400K : aspects clinique, biologique et cytogénétique

P	Age ¹ /sexe	Cancer initial	Traitements ²	FAB	Caryotype au diagnostic de t-LAM	FISH	Type de LAM induite
t-jal	61/F	t-LAM3	ATII/AraC/Atra	LAM7	45,XX,-7,der(18)t(18;21)(p21;q21)[12]	MLL WT	A
t-pic	59/M	PV	Hydroxyurée	LAM	Ish(der ?13)t(1;13)[6/15]	NF	I
t-bri	57/F	Cancer mammaire	RT	LAM 4Eo	46,XX,del(7)(q21q26),inv(16)(p13q22)[20]	MLL WT	A
t-gir	77/M	Cancer rectal	5FU/Oxaliplatine	LAM	46,XY[20]	MLL WT	I
t-pio	44/M	LH	ATII/Alk/CS Double autogreffe Rituximab/Gemzar/ATII /Velbe	LAM	44~45,XY,-3,der(5)+der(5)qdp(11)(q22q24), der(12)t(3;12)(q11;p12),- ?20[cp3][5]/ 44~45,XY,id,der(16)t(qdp11;16)(q22;p13)[5]/ 44~45,XY,id,der(7)t(7;qdp11)(q35;q22)[3]/ 44~45,XY,id,der(17)t(qdp11;17)(q22;p13)[2]/ 44~45,XY,id,der(4)t(4;qdp11)(p16;q22)[1]	MLL quadrupliqué	T
t-abo	55/F	Chondrosarcome	ATII/Cisplat/RT ATII/RT	LAM	46,XX,inv(11)(p15q22)[8]/ 46,XX,sl,i(17)(q10)[2]/ 46,XX,sd11,ins(1;20)(p3;q12),del(20)(q12q13)[20]		

Légende :

1= age au moment du diagnostic de t-LAM ; 2=Traitement du cancer primaire ;

P= patients ; Alk =alkylant; RT=radiothérapie; AT II=antitopoisomérase II; AM=antimétabolite; Tax=taxane; Fluda=fludarabine;

SP= sels de platine; LNH= lymphome non hodgkinien; Bléo=bléomycine; HT=hormonothérapie; LH= lymphome de Hodgkin; INF=interféron; curie=curiethérapie; TBI=Total Body Irradiation; Oncov=oncovin; PV= Polyglobulie de Vaquez

A = t-LAM de type post alkylant; T= t-LAM de type post antitopoisomérase II ; I= t-LAM induite post agent indéterminé

MLL WT = MLL Wild Type; MLL Rem= MLL remanié, NF = Non fait

Tableau 8 - Patients présentant une p-LAM pour l'analyse par aCGH 244K : aspects clinique, biologique et cytogénétique

P	Age/Sexe	FAB	Caryotype	FISH
p-1	68/F	LAM 1	45,XX,-7[15]	NF
p-2	34/M	LAM 6	45,XY,-7[20]	NF
p-3	66/M	LAM 1	48,XY,+8,+13[20]	NF
p-4	54/F	LAM 5	47,XX,+i(21q)[20]	NF
p-5	32/M	LAM 5	47,XY,t(2;14)(q21;q32),+4[20]	WCP2,WCP14
p-6	44/F	LAM 5	46,XX,der(5)t(1;5)(q32;q35),inv(9)(p12q13)[20].ish(5p15,5q31)x2,add(5)(q35 ?)(wcp1+)	MLL WT, wcp1,wcp5,wcp17
p-7	66/M	LAM 5	46,XY,del(7)(q21q31),der(9)(WCP9=),?der(11)(q23)[18]/46,XY[2]	MLL WT
p-8	25/F	LAM 3	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[20]	PML-RARA fus
p-9	46/F	LAM 3	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[20]	PML-RARA fus
p-10	46/F	LAM 3	46,XX,t(15;17)(q22;q21)[20]	PML-RARA fus
p-11	27/M	LAM 3	46,XY,i(3)(p10),i(3)(q),t(15;17)(q22;q21)[20]	PML-RARA fus
p-12	47/M	LAM 3	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[20]	PML-RARA fus
p-13	73/M	LAM 3	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[20]	PML-RARA fus
p-14	35/M	LAM 3	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[18]	PML-RARA fus
p-15	57/M	LAM 3	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[20]	PML-RARA fus
p-16	54/M	LAM 4	46,XY,t(16;16)(p13;q22)[16]	CBFB fus
p-17	26/M	LAM 4 Eo	46,XY,t(16;16)(p13;q22)[19]	NF
p-18	19/M	LAM 2	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q31q34)[20]	NF
p-19	37/M	LAM 1	45,XY,t(9;11)(p22;q23),del(7)(p12;p21)[18]	MLL remanié
p-20	25/M	LAM 1	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[20]	MLL remanié
p-21	80/M	LAM 1	46,XY[3]/50-53,XY,-1,-3,-4,-15 ?, -21,+7 à 10 mar[17]	NF
p-22	42/M	LAM 1	46,XY,t(3;5)(q25;q34),del(4)(q26),der(12)t(4;12)(q28;p12),der(18)t(12;18)(p12;q21),mar ?[...]	WPC 3,4,5,12
p-23	30/M	LAM 5	46,XY,t(11;12)(q13;p13)[2]/46,XY,id,der(1)t(1;1)(p16;q12)[1]/46,XY,id,der(7)t(1;7)(q12;q36)[1]/ 46,XY,id,der(9)t(1;9)(q12;p24)[2]/46,XY,id,der(14)t(1;14)(q12;p10)[2]/ 46,XY,id,der(20)t(1;20)(q12;p12)[1]/46,XY,id,der(20)t(1;20)(q12;q13)[2]/ 46,XY,id,der(21)t(1;21)(q12;q10)[3]	NF
p-24	71/M	LAM 2	43-46,XY,-2,-5,-7,-16,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4, variations	NF

Tableau 8 – Suite

P	Age/Sexe	FAB	Caryotype	FISH
p-25	63/F	LAM 2	46,XX[20]	NF
p-26	52/F	LAM 2	46,XX[20]	MLL WT
p-27	23/F	LAM 2	46,XX[20]	MLL WT
p-28	23/F	LAM 5	46,XX[20]	MLL WT
p-29	45/F	LAM 5	46,XX[20]	NF
p-30	73/F	LAM 5	46,XX[20]	NF
p-31	31/M	LAM 0	46,XY[20]	MLL WT
p-32	75/M	LAM 1	46,XY[20]	MLL WT
p-33	41/M	LAM 1	46,XY[20]	MLL WT
p-34	48/M	LAM 2	46,XY[20]	MLL WT
p-35	38/M	LAM 2	46,XY[20]	MLL WT
p-36	63/M	LAM 4	46,XY[20]	NF

Légende :

P=patients ; MLL WT=MLL Wild type; fus= fusion, NF= Non fait

Tableau 9 - Patients présentant une p-LAM pour l'analyse par aCGH 2x400K : aspects clinique, biologique et cytogénétique

P	Age/ Sexe	FAB	caryotype	FISH
p-joy	42/M	LAM 2	46,XY[20]	MLL WT
p-out	62/M	LAM 0*	46,XY[18]	MLL WT
p-bar	76/F	LAM 2	46,XX[5]	MLL WT
p-dou	47/M	LAM 5**	46,XY[20]	MLL WT
p-vio	55/F	LAM 0	46,XX[20]	MLL WT
p-lah	46/F	LAM 5	46, XX, 21 ps+[12]	MLL WT
p-bia	70/M	LAM 1	46,XY[19]	MLL WT
p-gui	56/F	LAM 4	46,XX[21]	MLL WT
p-hei	69/F	LAM 5 ?	Pas de mitose	NF
p-hen	82/M	LAM 0	46,XY[26]	MLL WT
p-abr	53/M	LAM 4	46,XY[20]	MLL WT
p-brt	73/M	LAM 4	46,XY,del(7)(q21q31)[12]	NF
p-gia	39/F	LAM 5b	48,XX,+8,?add(11)(q23),+13[3]/36-44,XX,-14,-22inc[cp4]/ 46,XX,+8,+13,-14,-22 [1]/46,XX [10]	MLL douteux

*contexte de thrombopénie familiale: étude de RUNX1 des membres de sa famille: pas de mutation détectée.

** contexte de cancers familiaux.

Légende :

P=Patients ; MLL WT= MLL Wild type ; NF= Non fait

I.4. Culture des fibroblastes

Cette étape a été choisie pour obtenir de l'ADN constitutionnel, la plupart des patients atteints de leucémie au moment de ce travail étant déjà (malheureusement) décédés, l'obtention d'un prélèvement de tissu normal de référence était exclue.

Lorsque le nombre de cellules est $\geq 6.10^6/ml$, 1/3 de la solution est prélevée pour une mise en culture. Les 2/3 restants sont réservés pour l'extraction de l'ADN.

Le milieu de culture initial comprend 20% de SVF dans du RPMI pour un volume total de 10ml. Les flacons de cultures ventilés de 50 ml sont placés dans un incubateur à 37°C.

Lorsque le nombre de cellules est $\leq 6.10^6/ml$, il n'y aura pas de culture car on privilégiera l'extraction d'ADN dans tous les cas.

A J1, le milieu est changé afin de retirer un maximum de cellules blastiques en suspension. La composition du nouveau milieu comprend 10% de SVF dans du RPMI pour 10ml de volume total. La même opération est pratiquée entre J7 et J9 puis entre J14 et J16 et enfin aux alentours de J21. À chaque fois les flacons sont replacés à 37°C.

Chaque flacon est observé au microscope inversé afin de repérer les plages de cellules adhérentes dont l'aspect morphologique ressemble à des fibroblastes.

Bien que ce paragraphe fasse partie du chapitre résultat, il est nécessaire, dès à présent de préciser que la culture des fibroblastes médullaires des t-LAM a échoué excluant l'extraction d'ADN constitutionnel des malades à partir de la moelle congelée. L'ADN témoin de référence, pour l'ensemble de la technique d'aCGH, est un ADN humain commercial, poolé (Proméga®).

I.5. Scanning et bio informatique

Un profil traduit en pixels (en intensité de rouge ou de vert) avec chacun des fluorochromes est obtenu pour chaque patient. Le logiciel Feature Extraction assure un contrôle qualitatif en post hybridation et une traduction en fichier texte des variations d'intensité des pixels rouges et verts de chaque lame. Ensuite si la lame est validée, le logiciel CGH Analytics permet l'acquisition d'un profil combiné dont on peut moduler le seuil de sensibilité et d'autres paramètres. Pour les expériences en dye swap, on peut combiner, spot par spot, les résultats des deux lames. Cette procédure assure un lissage non négligeable.

La synthèse de chaque anomalie est reportée sur un tableau Excel à partir des données de Feature Extraction. Ce tableau précise la référence de l'échantillon, le chromosome et ses bandes concernées. On voit également où débute et se termine l'anomalie au nombre de mégabases près. Sur ce tableau, ces anomalies sont référencées en gain ou en perte ainsi que le ratio de significativité par rapport à 1 (les gains significatifs ont un ratio supérieur à 1,5, les pertes un ratio inférieur à 0,5). Enfin il est précisé combien d'oligonucléotides sont concernés par l'anomalie. L'analyse ne prendra en compte qu'un nombre d'oligonucléotides supérieur à 5 (certains polymorphismes étant quelques fois de petite taille).

Une autre colonne du tableau reprend les coordonnées de la localisation de la région dite anormale. Chaque case de cette colonne peut être copiée et reportée sur le site www.genome.ucsc.edu Genome Browser où sont répertoriés tous les gènes connus ou hypothétiquement connus sur tout le génome. Ce site permet de visualiser la zone d'intérêt et les gènes qu'elle contient.

Pour un souci d'homogénéité dans les résultats pendant la durée du travail, la dénomination des

gènes et surtout leur localisation, ainsi que celle des accidents, a été faite à partir de la NCBI 36/hg 18 de l'institution UCSC Human Genome browser.

II. POUR L'ETUDE DU TRANSCRIPTOME ET DU miRNOME

II.1 Patients étudiés

La disponibilité des échantillons est réduite.

Il s'agit des patients t-2, t-16, t-19, t-28, t-30 dans le groupe des t-LAM et des patients p-3, p-5, p-11, p-16, p-21, p-28 et p-33 pour le groupe de p-LAM.

II.2 Extraction des ARN totaux et bio informatique

L'extraction des ARN s'est faite à partir d'échantillons de moelle totale disponible provenant des 5 t-LAM et des 7 p-LAM.

L'ARN témoin a été obtenu à partir d'échantillons de moelle normale non atteinte par un processus malin, cryopréservée de patients suivis pour d'autres pathologies à l'IGR.

Chaque échantillon a été placé dans du TRIzol[®] (300 µl) auquel sont ajoutés 140 µl de chloroforme. La solution est vortexée pendant 10 secondes. Chaque échantillon incube pendant 15 minutes à température ambiante.

L'étape suivante est une centrifugation à 12000 g pendant 15 minutes à 4° C. Un anneau blanchâtre apparaît. La phase aqueuse est recueillie et transférée dans un nouveau tube, soit environ un volume de recueil de 350 µl.

Un volume d'Isopropanolol est ajouté et la solution incube pendant 10 minutes puis une nouvelle centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes à 4° C est effectuée.

Le surnageant est retiré. Il reste le culot.

Deux lavages successifs à l'Ethanol 75% sont effectués, chacun suivis d'une centrifugation à 12000 g pendant 5 minutes à 4° C. Le surnageant est à chaque fois éliminé.

Les traces d'Ethanol sont évaporées et reste le culot contenant l'ARN qui sera dissous dans 30 µl d'eau nuclease free.

Chaque échantillon est fractionné en 2 parties : l'une servira pour l'étude du transcriptome l'autre pour le miRNome.

La première fraction est purifiée sur une colonne RNAesy (Quiagen[®]).

La quantité minimale d'ARN pour le transcriptome est de 1,5 µg, celle pour le miRNome est de 500 ng.

La qualité des ARN a été validée par le Bioanalyzer[®] d'Agilent[®].

La puce utilisée est une micro-array 2x44K (Agilent[®]).

Le contrôle qualité de chaque lame est effectué par le logiciel Feature Extraction[®].

Pour l'étude du transcriptome, différents tests statistiques (test de Rosetta...), sont appliqués pour rendre des résultats en ratio (analyses différentielles). Une analyse fonctionnelle est réalisée en GOterm.

Pour l'étude du miRNome, après colligation des arrays, une normalisation inter-array et moyennage, un T test est effectué pour une analyse différentielle.

RESULTATS

I. CULTURE DES FIBROBLASTES MEDULLAIRES

Initialement la culture des cellules du stroma médullaire, en particulier des fibroblastes, avait pour but d'obtenir de l'ADN constitutionnel afin de s'affranchir le plus possible du polymorphisme inter individuel. Chaque ADN aurait servi d'ADN de référence pour chaque patient correspondant.

Finalement cette partie du projet a été abandonnée car aucune culture n'a pu aboutir (1 seul échantillon est allé jusqu'à confluence, 5 cultures ont avorté avec un départ tardif vers J21).

La culture n'est pas mise en question car de la moelle osseuse de patients ayant eu une leucémie aiguë *de novo* a été décongelée (n=8) et mise en culture dans les mêmes conditions. Celles ci se sont bien comportées et ont débuté leur pousse vers J10 - J12.

On peut supposer que les cellules du stroma médullaire tout comme les cellules hématopoïétiques ont subi des remaniements qui les empêchent d'avoir un comportement normal (cycle cellulaire, adhérence...)

II. CYTOGENETIQUE

Dans la première série des t-LAM il y a majoritairement des dissociations de la région 11q23 (n=6), des monosomies 7 (n=5) (isolées ou associées) ou des délétions du 7q (n=5), des caryotypes normaux (n=5) ou des caryotypes complexes (n=4). Les autres anomalies sont moins fréquentes (n<4) : monosomie 5, délétion du 5q, trisomie 8, translocations t(15 ;17), t(8 ;21), inv(16). On compte également 4 LAM à caryotype MK. Dans la deuxième série de t-LAM, on relève 2 anomalies portant sur le chromosome 7, la moitié des cas sont des caryotypes complexes. On note aussi une quadruplication de la région 11q23.3. On dénombre un cas de LAM à caryotype MK.

Dans la première série des p-LAM on relève 3 monosomies 7, 2 délétions du 7q non isolées, 4 caryotypes complexes, 8 translocations (15;17), 3 caryotypes avec remaniement du *CBF*, 2 remaniements du 11q23 et 12 caryotypes normaux. Il n'y a pas de LAM à caryotype MK. Dans la seconde série de p-LAM, la majorité des caryotypes sont normaux et il n'y a pas de translocation équilibrée. Il y a un cas avec un caryotype monosomique MK.

III. COPY NUMBER VARIATIONS : CNV

La présence de CNV dans les résultats est prévisible car l'ADN normal est constitué d'un pool d'ADN humain. Puisque les cultures de fibroblastes médullaires ont été un échec dans les t-LAM et il a été décidé d'utiliser un ADN commercial composé de plusieurs individus du même sexe.

Un grand nombre de CNV a été facilement retiré de l'ensemble des résultats selon 4 faisceaux d'arguments : i) une taille inférieure à 2 Mb pour une séquence, ii) des points de cassures similaires et récurrents retrouvés parmi plusieurs patients, iii) des groupes de gènes tels que ceux

de l'olfaction ou de détoxification iv) consultation de la Database of Genomic Variants (Voir tableau 10A).

Quelques variations de séquence de moins de 2 Mb ne sont pas classées en CNV mais en CNA car elles contiennent un ou des gènes pouvant avoir une implication dans la prolifération, la différenciation ou dans le cycle cellulaire.

Tableau 10A – Tableau (non exhaustif) des CNVs constitutionnels le plus souvent retrouvés

Localisation	Quelques gènes du CNV	miRNA
-1p36.13 <16.71-17.14>	<i>CROCC, MSTP9, ESPNP</i>	
-1q21.3 <150.82-150.84>	<i>NLCE3C</i>	
-1q23.3 <159.75-159.90>	<i>FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, HSPA6</i>	
-1q44 <246.79-246.86>	<i>OR2T34, OR2T10, OR2T11</i>	
+/-3q29 <196.90-196.96>	<i>MUC20</i>	miR-570
+/-4q13.2 <69.05-69.16>	<i>UGT2B17</i>	
+5p15.33 <0.76-0.87>	<i>ZDHHC11</i>	
-6p25.3 <0.20-0.32>	<i>DUSP22</i>	
+/-6p21.2 <32.56-32.72>	<i>HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DRB5, HLA-DRB6</i>	
+/-8p11.3 <39.35-39.50>	<i>ADAM3A</i>	
-10q11.22 <46.37-47.73>	<i>ANXA8 PPYR1 GPRIN2 SYT15 ANTXRL</i>	
+11q11 <55.12-55.20>	<i>OR4P4, OR4C11, OR4S2, OR4C6</i>	
+12p12 <19.36-19.46>	<i>PLEKHA5</i>	
+/-14q11.2 <18.62-19.49>	<i>OR4K5, OR4K,1 OR4N2, OR4K2, OR4Q3, OR4M1</i>	
+/-15q11.2 <18.65-20.08>	<i>BCL8, NF1P1, OR4N4, OR4M2</i>	miR-1268
+/-15q14 <32.51-32.62>	<i>GOLGABB</i>	miR-1233
+/-16p11.2 <31.86-33.53>	<i>TP53TG3, SLC6A10P, HERC2P4</i>	miR-1826
+17q21.31 <41.52-41.57>	<i>KIAA1267</i>	
-17q21.31 <41.55-42.04>	<i>NSF, LRRC37A, ARL17P1, KIAA1267, LRRC37A2</i>	
-19q13.2 <48.20-48.43>	<i>PSG1, PSG3, PSG6, PSG7, PSG11</i>	
+/-22q11.23 <22.65-22.72>	<i>GSTT1</i>	

Tableau 10B – CNV acquis

Localisation	Gènes du CNV
-2p11.2 <89.10-89.26>	<i>IGKC IGKV1-5, IGKV3D-1,5 IGKV1D-13, IGKV3-20 IGKV2-24</i>
+/-7p14.1 <38.22-38.41>	<i>TRGC2, TRGV5, TRGV7, TRGV9, STARD3NL</i>
+/-14q11.2 <21.43-22.04>	<i>TRA@, TRD@, TRDV1, TRAV20, TRAJ17, TRAC</i>
-14q32.33 <105.13-106.00>	<i>IGH@, IGHA1, IGHA2, IGHG1, IGHG2, IGHG4, IGHV4-31, C14orf81</i>

IV. CAS PARTICULIERS DES CNV ACQUIS

Parmi les t-LAM, des délétions des gènes des immunoglobulines sont trouvées. Elles sont consécutives aux réarrangements des séquences VDJ des immunoglobulines. Ces recombinaisons particulières sont des CNV acquis comme déjà décrits précédemment : ils font partie des caractéristiques génotypiques du clone malin des cellules pathologiques.

On relève surtout que le nombre de ces CNV des immunoglobulines est plus élevé dans les t-LAM : 4 pertes en 2p11 contenant *IGLK* et 9 en 14q32.3 contenant *IGH*. Dans les cas t-15, t-17 et t-25, ces 2 gènes sont réarrangés (tableau 7). A noter que les patients t-2 et t-7 sont, selon la classification FAB et leur immunophénotypage, des leucémies biphénotypiques. Parmi les p-LAM, 3 sujets présentent ce même type de réarrangement : celui d'*IGLK* chez le patient p-21, d'*IGH* chez p-24 et p-joy. Cette différence de nombre est statistiquement significative ($p < 0,002$) (Voir tableau 10B).

V. CORRELATION CARYOTYPES ET ANOMALIES GENOMIQUES ACQUISES PAR aCGH HAUTE RESOLUTION

Les caryotypes et les résultats de l'aCGH sont bien corrélés. Cette corrélation est retrouvée aussi bien à la résolution 244 K que 400K. Cependant, dans trois cas (t-3, t-7, t-11), certaines anomalies bien visibles au caryotype ne sont pas vues en aCGH : le clone malin peut ne pas être majoritaire et le seuil de sensibilité de la technique en aCGH ne permet pas de le mettre en évidence.

Dans tous les cas, les translocations équilibrées ne sont pas visibles en aCGH puisque le matériel nucléotidique reste identique par rapport à celui du témoin de la lame (voir figure 5A).

Figure 5A – Profil du patient t-21 présentant une t(9;11)



La translocation équilibrée n'est pas visible. Les petits accidents sont des CNV.

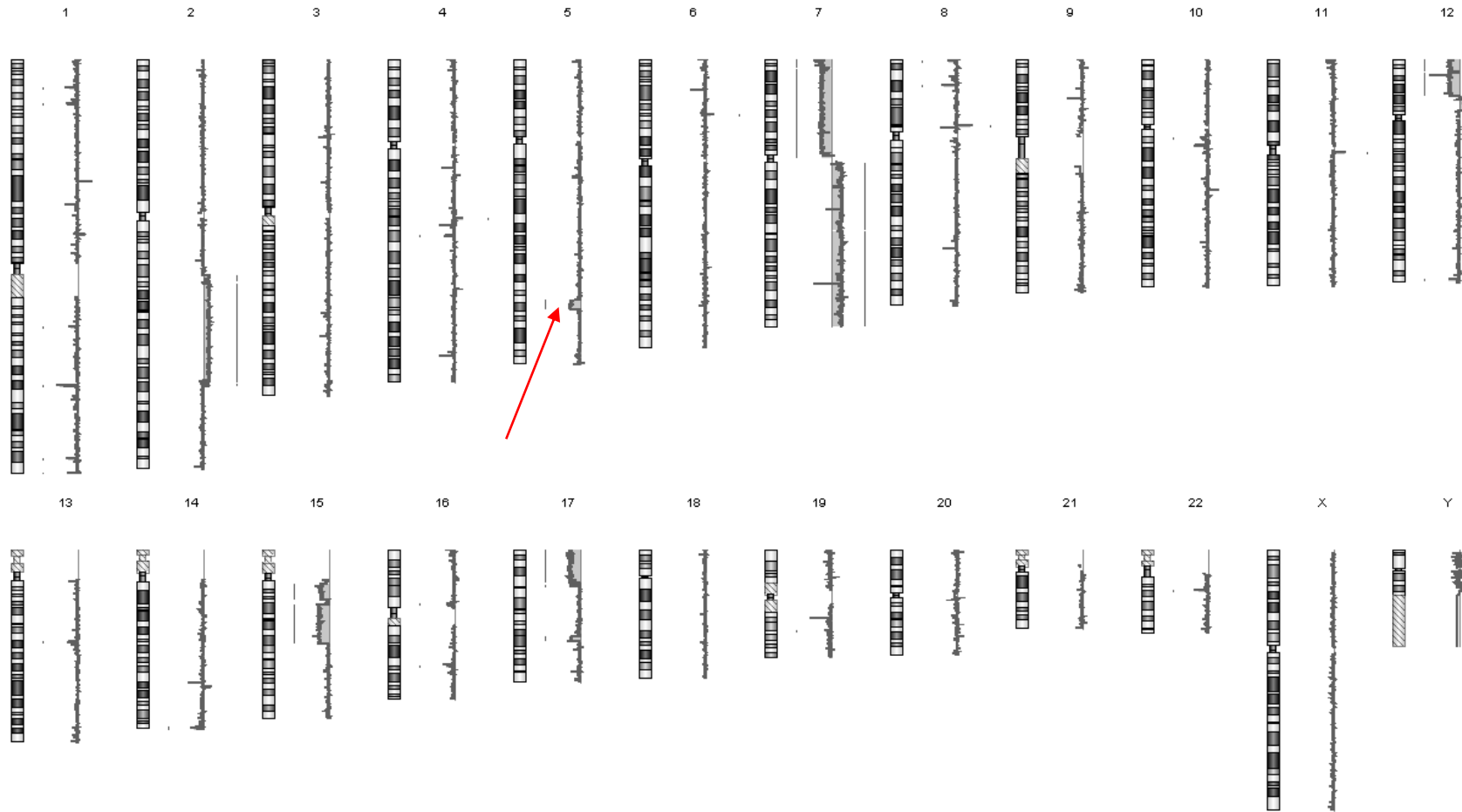
VI. COPY NUMBER ABNORMALITIES : CNA

En utilisant les lames 244K, on trouve 96 CNA qui ne sont pas détectées par le caryotype sur métaphase. Les lames de 2x400K permettent d'en retrouver également 96. Ces anomalies sont de taille infra cytogénétique ne pouvant être vues par la technique du caryotype standard. Cela permet également de mettre en évidence d'autres anomalies au sein d'un caryotype complexe (voir figure 5B).

Comme on a déjà pu le constater, quelque soit le groupe de leucémies et le type de lame utilisée, les translocations dites équilibrées ne sont pas visibles sauf dans les cas t-3, t-5, t-12, p-13 et p-18 (soit 5 cas), où une CNA se trouve près des points de cassure. Une analyse supplémentaire n'a pas pu être poursuivie pour le patient t-3 car on ne dispose plus de matériel. Les résultats en aCGH pour le patient t-3 montre qu'en 12p il existe une petite perte débutant au milieu du gène *ETV6*, ce qui laisse supposer un remaniement possible de ce gène. Lors du diagnostic de LAM2 avec translocation t(8;21) chez le patient t-12, aucune analyse complémentaire n'avait été entreprise du fait du bon pronostic connu de ce type de leucémie. C'est l'aCGH qui a révélé une duplication en 21q22.1qter, confirmée ensuite par une FISH. Le point de cassure de cette translocation déséquilibrée de 30 Kb est centromérique en 3' du gène *RUNX1*. Quant au patient p-18, la translocation t(8;21) est associée à une perte de 1 Mb incluant les 2 premiers exons du gène *RUNXT1* en 8q21.3. Enfin, le patient p-13 présente une translocation t(15;17) associée à une petite duplication de la partie télomérique du gène *RARA* et *TOP2A*.

Dans certains cas, la confrontation caryotype/aCGH permet de préciser les réarrangements déjà vus au diagnostic ; dans le cas du patient t-13, une add(1)(q3 ?) a été définie, en aCGH, où on voit clairement qu'il s'agit d'une translocation non équilibrée entre le bras long du chromosome 1 et le bras court du chromosome 2. Ainsi on peut revoir le caryotype à cet endroit et inscrire der(1)t(1;2)(q42.3;p16.1). Le point de cassure en 1q42.3 <231.374> passerait entre les exons 11 et 12 du gène *PCNXL2* ; le point de cassure en 2p16.1 <54.943> passerait au voisinage de l'exon 12 du gène *EML6* (voir figure 5C et annexe tableau 11).

Figure 5B – Profil en aCGH 244K d’une t-LAM à caryotype complexe (patient t-4)



La flèche rouge indique une anomalie de 5,28 Mb en 5q31.1q33.1 non détectée par le caryotype au diagnostic

Figure 5C – Profil en aCGH 244K du patient t-13



VII. RESULTATS DES PATIENTS t-LAM PAR aCGH 244K

Vingt sept patients ont reçu une polychimiothérapie associant des AA aux ATII, certains ont également reçu des rayons, 3 patients n'ont été traités que par radiothérapie seule.

Le type d'induction par les agents toxiques aboutissant aux t-LAM a été déterminé par les résultats cytogénétiques classiques (voir tableau 2). Neufs cas sont considérés comme secondaires aux AA, 9 autres aux ATII. En revanche, les CNA des autres cas ne permettent pas une orientation de ce type car il n'est pas possible à l'heure actuelle des connaissances d'acquérir une information discriminante.

On compte parmi vingt-cinq patients (80%), 104 CNA avec 63 pertes et 41 gains (voir tableau 11), dont six patients présentant un caryotype normal qui ont une CNA. Six autres patients (20%) n'ont aucune CNA : 3 cas à caryotype normal, 2 avec une t(15;17) et 1 avec une t(X;11)(X;q23). Le nombre moyen de CNA pour l'ensemble des patients est de 3,46. La longueur moyenne des CNA des patients présentant une anomalie quantitative est de 4,1 Mb.

VIII. RESULTATS DES PATIENTS t-LAM PAR aCGH de 2x400K

On constate 2 cas présentant des anomalies chromosomiques (tableau 7) que l'on pourrait raccorder aux AA bien que le cas t-jal ait reçu des ATII (voir annexe tableau 12).

On compte 30 CNA (15 gains et 15 pertes). Le nombre de gains s'explique par la région 11q du patient t-pio. Celle-ci est en fait segmentée en 20 CNA car le ratio linéaire de chacune est distinctement différent (voir figure 6). Ainsi en excluant ces 20 CNA amplifiées qui n'en formeraient que trois plus grandes, le nombre de perte dans ce petit groupe de patients t-LAM resterait au moins égal au nombre de gains.

Parmi les 6 cas, seul le patient t-gir (soit 16%), qui présente un caryotype normal, n'a pas de CNA.

Le nombre moyen de CNA pour ce groupe est de 5. La longueur moyenne des CNA est de 22,6 Mb pour cette série.

IX. RESULTATS DES PATIENTS p-LAM PAR aCGH 244K

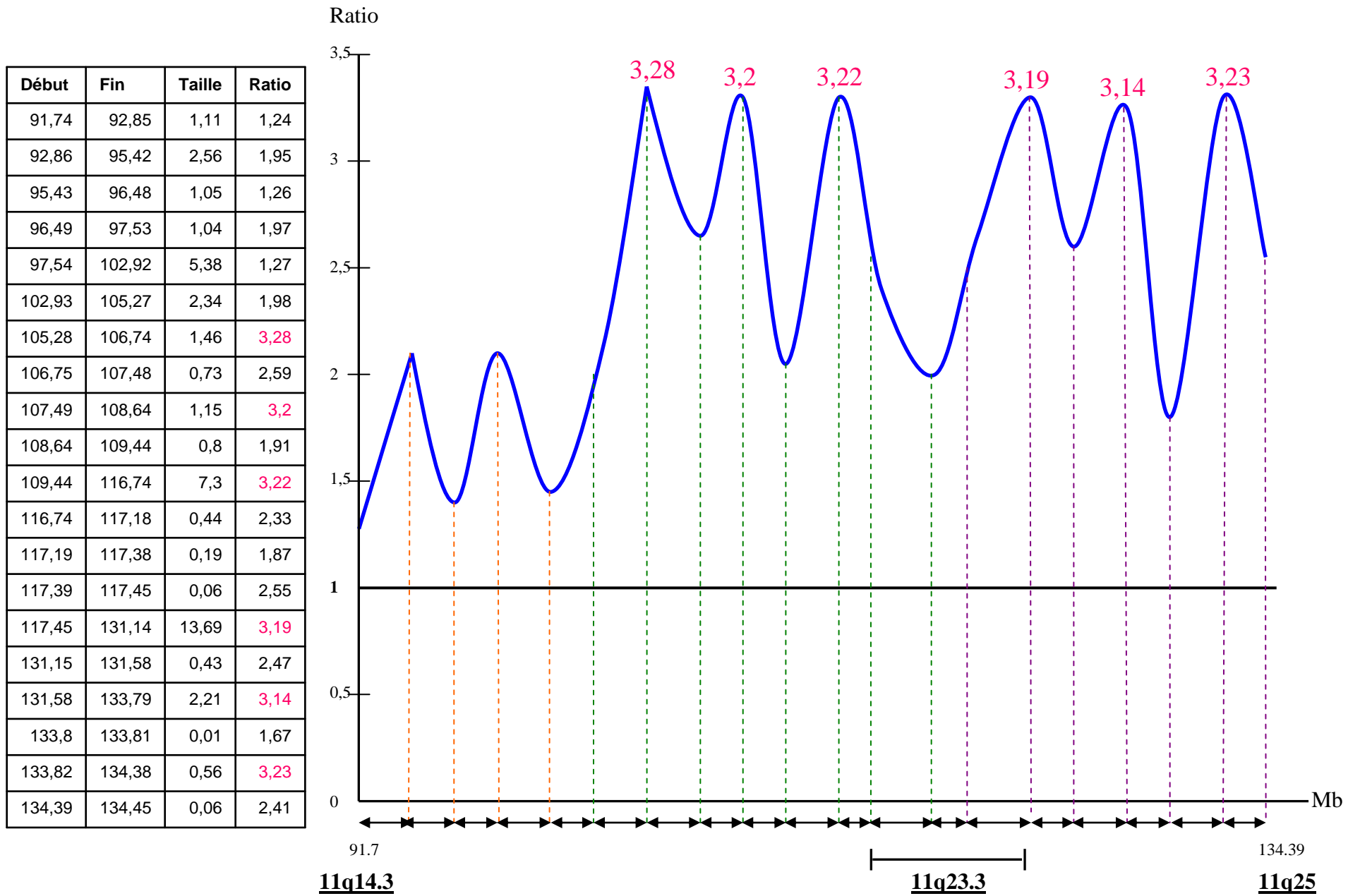
Parmi les 36 patients, 12 présentaient un caryotype normal, 4 comprenaient des anomalies des chromosomes 5 ou 7, 9 avaient une translocation t(15;17) (voir tableau 7). On observe 64 CNA dont 32 pertes et 36 gains. Le nombre moyen de CNA pour ce groupe est de 1,78. Vingt-deux patients ne présentent aucune CNA (11 p-LAM à caryotype normal et 11 avec une translocation équilibrée). On décompte 4 cas avec un caryotype très complexe qui fournissent un nombre moyen de CNA à 2,66 parmi les patients avec des anomalies de nombre (voir annexe tableau 13).

X. RESULTATS DES PATIENTS p-LAM PAR aCGH 2x400K

Dans cette série de 13 patients, 10 présentaient au diagnostic un caryotype normal, un seul avait un caryotype complexe et enfin un présentait une délétion du bras long du chromosome 7 (voir tableau 14). On dénombre 63 CNA dont 42 pertes et 21 gains.

Le nombre moyen de CNA par patient est de 4.86 (voir tableau 14). La majorité des CNA sont de très petite taille, dépassant rarement 0.10 Mb.

Figure 6 - Amplification de la région 11q du patient t-PIO



XI. LES REGIONS MINIMALES CRITIQUES

On choisit de définir des régions minimales critiques (RMC). Ce sont des localisations génomiques retrouvées, par aCGH (244K et 2x400K), communes entre au moins 2 patients. Dans chaque groupe de LAM, t ou p, des RMC sont ainsi mises en évidence (voir tableaux 15 et 16). Ainsi 14 RMC sont mises en évidence parmi les t-LAM et 9 parmi les p-LAM. On remarque que la plus petite RMC, de 0,04 Mb est trouvée dans le groupe des t-LAM alors que dans les p-LAM, elle est de 0,05 Mb. La plus grande RMC en t-LAM est de 36,44 Mb, celle en p-LAM est de 45,69 Mb (voir tableaux 15 et 16).

XII. CNA ISOLEES

Des CNA ont été retenues par leur localisation sur des portions chromosomiques suscitant un intérêt leucémologique : chromosomes 5, 7, 12, 17 par exemple, ou bien des gènes intéressants qui s'y trouvent : *RUNXT1*, *NFI*.

L'ensemble de ces CNA est reporté dans les tableaux 17 et 18, 19 et 20.

Tableau 15– Régions minimales critiques dans le groupe des t-LAM (aCGH 244K et 2x400K confondues)

Patients	RMC (localisation en aCGH)	Taille (Mb)	Gènes possibles
Patients t-2 et t-13	-1q44 <241.94-247.19>	5.25	>25 gènes dont SMYD3
Patients t-5 et t-17, t-pio	-3p14.1p12.3 <69.67-71.50>	1.83	MITF, FOXP1
Patients t-1, t-2, t-4, t-5, t-pio	-5q31.3q33.1 <142.91-148.19>	5.28	ADRB2, DPYSL3, HTR44, POU4F3, PPP2R2B, SPINK1, JAKMIP2, TCERG1, SPINK5, LARS, RBM27, KCTD16, HMHB1, FBXO38, YIPF5, SPINK7, SCGB3A2, GPR151, PRELID2, SH3RF2, PLAC8L1, STK32A, SPINK6, SPINK9
Patients t-9, t-17	+6q27<168.12-168.32>	0.20	KIF25, FRMD1, HGC 6.1.1
Patients t-5, t-6, t-7, t-9, t-10 , t-jal	-7p22.2 <3.02-3.12>	0.10	GNA12, CARD11
Patients t-14, t-16, t-17, t-19, t-pio	+7p15.2 <27,15-27,17>	0,02	HOXA6, HOXA7, HOXA9, HOXA10, miR-196b
Patients t-2, t-5, t-6, t-7, t-9, t-10	-7q21.3 <97.69-101.88>	4.19	NPTX2, LMTK2, BRI3, BAIAP2L1, BHLHB8, CUX1, miR-86, miR-93, miR-106b, miR-548o
Patients t-pio, t-jal, t-bri	-7q31.3 <119.08-128.28>	9,20	KCND2, ING3, FAM3C, WNT16, PTPRZ1, AASS, FEZF1,CAPDS2,IQUB,LMOD2,WASL,SPAM1,GPR3 7,POT1,GRM8,ZNF800,SND1,GCC1,PAX4,LRRC4LE P,IMPDH1,METTL2B,OPN1SW,HIG2,CALU,FLNC, miR-592, miR-593, miR-129-1, miR-182, miR-96, miR-183, miR-335, miR-29a, miR-29b-1, miR-490, miR-548f-4, miR-1975, miR-671
Patients t-2 , t-5, t-6, t-7, t-8, t-9	-7q33q34<135.74-137.48>	1.74	CHMR2, PTN, DGK1, CREB3L2, miR-490
Patients t-pio, t-jal, t-bri	-7q34 <141.46-158,27>	16.81	TPRV5, KEL, PIP,GSTK1,TMEM139,CASP2,CLCN1,ZYX, TPK1,NOBOX,CNTNAP2,CUL1,EZH2,FASTK,TMU B1,AGAP3,PRKAG2,LRRC61,NOS3,ATG9B,ABC8, CRYGN,GBX1,NUB1,RHEB,MLL3,ARP11,DPP6,EN 2,SHH,RNF32,LMBR1, MNX1,PTPRN2, miR-548f-4,miR-1975, miR-671, miR-153-2, miR-595
Patients t-3 , t-14	+8q24.3 <143.73-143.9>	0.17	PSCA, LY6D, JRK, C8orf55, LY6K, SLURP1, LYNX1, LYPD2
Patients t-2, t-4, t-5 , t-pio	-12p13.2p13.1<11.82-13.33>	1.51	ETV6, CDKN1B, CREBL2, EMP1, GPR19, LRP6, GPRC5A, HEBP1, DDX47, MANSC1, GPRC5D, KIAA1467, BCL2L14, DUSP16, APOLD1, GSG1, HTR7P,miR-613, miR-614
Patients t-15, t-24	+17q21.3 <22.80-78.65>	55.85	17q en entier
Patients t-7, t-8, t-11 , t-29	-21q22.1 <35.11-35.15>	0.04	RUNX1

Tableau 16 - Régions minimales critiques dans le groupe des p-LAM (aCGH 244K et 2x400K confondues)

Patients	RMC (localisation en aCGH)	Taille (Mb)	Gènes
Patients p-23, p-24	+1q21q22<153.19-154.64>	1.4	>25 gènes, EFNA4, R1AP1, DPM3, YY1AP1, DAP3, ROBLD3, CCT3, CLK2
Patients p-6, p-23	+1q32.1q44<201.31-247.19>	45.69	Très nombreux gènes
Patients p-21, p-24, p-32	-3p21.3<44.20-49.02>	5.18	> 40 gènes, SMARCC1, NCKIPSD
Patients p-1 and p-2, p-7, p-brt	-7q31.2q36.3<122.84-153.49>	30.65	Très nombreux gènes et miR-592, miR-593, miR-182, miR-96, miR-183, miR-335, miR-29a, miR-29b1, miR-490, miR-548-f-4, miR-1975, miR-671
Patients p-18, p-21	-9q22.3q31.1<93.92-103.96>	9.81	>60 gènes, FANCC, XPA
Patients p-4, p-21	Amp 21q21.1<14.29-17.97>	3.78	LIPI ABCC13 RBM11 HSPA13 SAMS1 NRIP1, USP25 C21orf34 CXADR BTG3 miR-99a, miR-125b-2, hsa-let-7c
Patients p-hen, p-out	-21q22.1 <35.10-35.15>	0.05	RUNX1
Patients p-4, p-21, p-24	Amp 21q22.2 <38.27-43.54>	0.25	DSCR4, KCNJ15, ERG, ETS2, BRWD1 et autres gènes
Patients p-4, p-21, p-24	+21q22.3qter <43.54-46.91>	7,49	> 50 gènes

Tableau 17 – CNA isolées des patients t-LAM par aCGH 244K

CNA	Localisation (Mb)	Taille (Mb)	cas	Gènes et miRNA
+14q22.1	<47.25-52.51>	5.26	t-2	Contient plus de 30 gènes
-18q11.2q12.1	<21.74-24.41>	2.67	t-2	SS18 et 7 autres gènes
-18q22.3q23	<71.06-71.76>	0.69	t-2	TSHZ1
-1q42.3q44	<233.13-247.19>	14.06	t-13	Contient plus de 100 gènes
-10q11.2	<45.53-47.97>	2.44	t-13	Contient plus de 20 gènes
-12p13.2p13.1	<11.82-13.33>	1.51	t-5	Contient plus de 20 gènes dont ETV6, CDKN1B et miR-613, miR-614, miR-1244
+2p25.3	<2.54-3.57>	1.03	t-22	TSSC1, ADI1, RNASEH1
-17q11.2	<25.96-27.38>	1.42	t-14	EVI2A, EVI2B, NF1, OMG, SH3GLP2, SUZ12, CRLF3, C17Orf79, CENTA2, UTP6, C17Off42, ATAD5, RNF135, RAB11, FIP4, LRRC37B, SUZ12P, et miR-193a, miR-365-2
-4q31.2	<146.62-146.67>	0.05	t-15	SMAD1
-2p23.3	<25.31-25.60>	0.10	t-30	DNMT3A et miR-1301

Tableau 18 – CNA isolées des patients p-LAM par aCGH 244K

CNA	Localisation (Mb)	Taille (Mb)	cas	Gènes et miRNA
+3p21.3	<50.26-50.29>	0.03	p-24	GNAI2, SEMA3B
+3p21.3	<52.29-52.31>	0.03	p-24	NCLYKT et miR-135a-1
+3p14.1	<64.32-67.67>	1.94	p-21	LR1G1
-8q21.3q22.1	<93.15-94.17>	1.02	p-18	RUNXT1
-12p12.1p13.2	<11.40-21.20>	9.8	p-22	Contient plus de 20gènes dont ETV6, CDKN1B
-17p11.2q12	<0.18-29.54>	29.36	p-24	Contient plus de 50 gènes
+15q23	<67.44-68.37>	3.31	p-24	KIF23, RPLP1, TLE3 et miR-629
-18q21.2	<48.99-51.05>	2.06	t-14	DCC

Tableau 19 – CNA isolées des patients t-LAM par aCGH 2x400K

CNA	Localisation (Mb)	Taille (Mb)	cas	Gènes et miRNA
+1q21.1q44	<142.72-247.18>	104.46	Pic	Très grande quantité de gènes et 28 miRNA
-1q25.2	<177.36-177.48>	0.12	Pic	ABL2
-3p26.3p14.1	<0.03-71.50>	71.47	Pio	RAD18, SEMA3F,GNAT1,GNAI2,HYAL1,HYAL2,IFRD2,ZMYND10,TMEM115, HEMK1,CISH,MAPKAPK3,RBM15B,ARMET,RAD54L2,GRM2,PARP3, PCBP4, ABHD14B,ACY1,WDR51A,TLR9,TWF2,PRKCD, FHIT,PRICKLE2,MITF,FOXP1 mir-885,mir-563,mir-128-2,mir-26a-1,mir-138-1,mir-564,mir-1226,mir-191, mir-425,mir-566,let-7g,mir-135a-1
+4p16.3	<0.07-24.11>	24.04	Pio	Plus de 50 gènes et mir-571, mir-943, mir-95, mir-548i-2,mir-572,mir-218-1
-5p15.3q11.1	<0.14-49.67>	49.53	pio	TERT, MRPL36, CTNND2, FBXL7, SKP2, FYB, GHR, NNT, FGF10 et 31 miRNA
-5q13.2q35.3	<72.84-158.81>	85.97	Pio	Très grande quantité de gènes
+7p15.2	<27.13-27.17>	0.04	Pio	HOXA4, HOXA5, HOXA6, HOXA7, HOXA9
-7p22.2q31.1	<2.78-109.24>	106.46	Jal	Très grande quantité de gènes et 32 miRNA
+8q24.3	<141.65-141.72>	0.07	Jal	EIF2C2
+8q24.3	<145.08-145.09>	0.01	Abo	PLEC1 et mir-661
+10q22.3	<77.95-77.96>	0.01	Abo	C10orf11
+11p15.2	<15.02-15.05>	0.03	Abo	CALCB
+11q14.3q25*	<91.74-134.45>	42.71	Pio	Nombreux gènes dont MLL
-12p13.3	<0.09-6.83>	6.74	Pio	LTBR, RAD52, ERC1 et 2 miRNA : U85, ACA57
-12p13.3p13.1	<9.04-14.40>	5.36	Pio	KLRG1, KLRD1, KLRC1, KLRK1, KLRC2, PRR4, OLR1, PRB4, PRB1, BCL2L14, MANS1, ETV6, LRP6, CREBL2, GSG1, HEBP1, GRIN2B et 3 miRNA : mir-1244, mir-613, mir-614
-12p13.1p12.1	<14.71-23.77>	9.06	Pio	REG, PTPO, MGST1, EPS8, RERGL, PIK3C2G, RECQL, CMAS, ETNK1, SOX5 2 miRNA : mir-1244, mir-613,mir-614
+12q24.3	<131.42-131.70>	0.28	Pio	AUTSL2,P2RX2
-18p11.3p11.2	<0.00-14.11>	14.11	Jal	USP14,THOC1,CETN1,CLUL1,TYMS,ENOSF1,YES1,ADCYAP1,METTL4,NDC80, SMCHD1,EMILIN2,LPIN2,MYOM1,MRLC2,TGIF1,DLGAP1,MRCL3,ZFP161,EPB41L3, TTMA ,PTPRM,RAB12,NDUFV2,ANKRD12,RALBP1,PPP4R1,TWSG1,RAB31, TXNDC2, VAPA,APCDD1,NAPG,FAM38B,GNAL,MPPE1,IMPA2,TUBB6, SLMO1, SPIRE1,CEP76,PSMG2, PTPN2,SEH1L,C18orf19,C18orf1,RNMT,MC5R,MC2R
+21q11.2q22.3	<14.31-46.92>	32.61	Jal	Plus de 50genes dont RUNX1, ERG et ETS2, 4 miRNA : mir99-a, let-7c, mir-155, mir-802
+22q11.2	<21.33-21.98>	0.65	Pio	RAB36, BCR et mir-650
+Xq12	<67.49-67.53>	0.04	Pio	OPHN1

Tableau 20 – CNA isolées des patients p-LAM par aCGH 2x400K

CNA	Localisation (Mb)	Taille (Mb)	cas	Gènes et miRNA
-1p33	<49.69-49.76>	0.07	Dou	AGBL4
+5p15.2	<97.07-98.15>	1.08	Dou	AF009306,BC047112
+5p15.2	<10.47-10.68>	0.21	Dou	MARCH6, ROPN1L
+7p22.1	<6.20-6.21>	0.01	Gia	CYTH3
-7q11.2	<64.35-64.85>	0.50	Joy	ZNF92
-7q31.3q36.2	<122.84-153.49>	30.65	Brt	Très grande quantité de gènes 10 miRNA : mir-592,mir-593,mir-129-1,mir-182,mir-96,mir-183,mir-335,mir-29a,mir-29b-1,mir-490,mir-548f-4,mir-1975,mir-671
-8q11.2	<51.22-51.23>	0.01	Out	SNTG1
-8q24.1q24.2	<126.69-130.55>	3.76	Brt	FAM84B, POU5F1, MYC et mir-1204, mir-1205,mir-1206,mir-1207,mir-1208
+9q32	<114.46-114.66>	0.20	Gui	KIAA1958, C9orf80, SNX30
+10q11.2	<46.41-47.07>	0.66	Joy	GPRIN2, ANXA8, PPYR1, ANXA8L1
-10q23.1	<84.06-84.07>	0.01	Bar	NRG3
-14q11.2	<20.47-20.51>	0.04	Gui	RNASE2
-20q13.3	<59.45-59.52>	0.07	Brt	CDH4
+20q13.3	<60.03-60.06>	0.03	Bar	TAF4
+22q13.3	<45.92-45.98>	0.06	Bar	TBC1D22A
+Xp22.2	<16.56-16.88>	0.32	Dou	CTPS2,SYAP1,CXorf15,RBBP7,REPS2
+Xq28	<152.91-152.99>	0.08	Gui	IRAK1,MECP2

XIII. TRANSCRIPTOME

Ces résultats sont préliminaires.

XIII.1. Les gènes les plus surexprimés

Dans le groupe des p-LAM les gènes les plus surexprimés sont *SERPINB2*, *NPTX1*, *IL8*, *SLC7A11* et *CXCL5*. Ces deux derniers gènes n'ont ce niveau de surexpression que dans les p-LAM.

Dans le groupe des t-LAM, on retrouve les trois mêmes premiers gènes de la liste ci-dessus mais *MYCN* et *NPTX1* sont plus fréquents ou bien même exclusivement retrouvés dans les t-LAM comme *HOXA9*.

XIII.2. Les gènes les plus sous-exprimés

Dans le groupe des p-LAM, il s'agit des gènes *DEFA4*, *W60781*, *OLFM4*, *AMP* et *ARG1*.

Dans les t-LAM on trouve aussi les gènes *DEFA4* et *W60781* auxquels s'ajoutent *DEFA3* et dans une moindre mesure *OLFM4*.

XIII.3. Comparaison des résultats du transcriptome avec des gènes candidats des RMC

Les tableaux 21, 22, 23, 24 reprennent les niveaux d'expression des 18 gènes sélectionnés des RMC perdues et des 10 gènes des RMC gagnées.

Certains résultats peuvent paraître surprenants. Des gènes se retrouvent surexprimés dans des RMC perdues et inversement. Pour la plupart des gènes leur expression est identique à celle de la moelle témoin.

Le résultat le plus cohérent concerne le gène *HOXA9* qui est très largement surexprimé dans les t-LAM, jusqu'à un ratio de 71,03 chez le patient t-2.

Tableau 21 - Expression des gènes candidats des RMC perdues et leur expression dans 5 t-LAM de la série étudiée par aCGH 244 K

	t-19	t-30	t-28	t-16	t-2
SMYD3 (1q44)	/	/	+	+	/
PROK2 (3p13)	/	/	+	-	--
SHQ1 (3p13)	+	+	+	+	+
TET2 (4q24)	+	+	+	+	/
RASA1 (5q14.3)	/	/	/	/	/
PCSK1 (5q15)	/	/	/	/	/
EGR1 (5q31.2)	-	/	-	/	--
UBE2B (5q31.1)	/	/	/	/	-
PFTK1 (7q21.1)	/	/	/	/	-
TRRAP (7q22.1)	/	/	/	/	/
BUD31 (7q22.1)	/	/	/	/	/
ZNF394 (7q22.1)	/	/	/	/	/
MCM7 (7q22.1)	-	/	/	-	/
CARD11 (7p22.2)	/	-	-	-	/
ETV6 (12p13.2)	+	+	+	+	+
TP53 (17p13.1)	/	/	+	/	+
NF1 (17q11.2)	+	/	+	+	+
RUNX1 (21q22.1)	+	+	+	+	+

Les caractères / indiquent qu'il n'y a pas de différence d'expression significative par rapport à l'ARN référence

Les caractères - indiquent qu'il existe une sous expression significative par rapport à l'ARN référence

Les caractères + indiquent qu'il existe une sur expression significative par rapport à l'ARN référence

Tableau 22 - Expression des gènes candidats des RMC perdues et leur expression dans 7 p-LAM de la série étudiée par aCGH 244 K

	p-21	p-11	p-33	p-5	p-28	p-16	p-3
SMYD3 (1q44)	/	+	+	+	/	+	/
PROK2 (3p13)	-	-	-	-	--	/	/
SHQ1 (3p13)	/	+	+	+	/	+	+
TET2 (4q24)	/	/	/	+	+	/	/
RASA1 (5q14.3)	/	/	/	+	/	/	/
PCSK1 (5q15)	/	/	/	/	/	/	/
EGR1 (5q31.2)	--	/	/	+	-	-	-
UBE2B (5q31.1)	/	/	/	+	-	-	-
PFTK1 (7q21.1)	/	+	/	+	+	/	/
TRRAP (7q22.1)	/	/	/	/	/	/	/
BUD31 (7q22.1)	/	/	/	/	/	/	/
ZNF394 (7q22.1)	/	/	/	/	/	/	/
MCM7 (7q22.1)	/	/	/	-	/	-	-
CARD11 (7p22.2)	/	-	/	/	/	-	+
ETV6 (12p13.2)	+	+	+	+	+	+	+
TP53 (17p13.1)	/	+	+	/	/	+	+
NF1 (17q11.2)	+	+	/	+	+	+	+
RUNX1 (21q22.1)	+	+	+	+	+	+	+

Les caractères / indiquent qu'il n'y a pas de différence d'expression significative par rapport à l'ARN référence

Les caractères - indiquent qu'il existe une sous expression significative par rapport à l'ARN référence

Les caractères + indiquent qu'il existe une sur expression significative par rapport à l'ARN référence

Tableau 23 - Expression des gènes candidats des RMC gagnées dans 5 t-LAM de la série étudiée par aCGH 244 K

	t-19	t-30	t-28	t-16	t-2
HOXA6 (7p15.2)	/	/	/	/	/
HOXA7 (7p15.2)	+	+	+	/	++
HOXA9 (7p15.2)	+++	+++	+++	/	++++
HOXA10 (7p15.2)	+	+	++	/	+
PSCA (8q24.3)	+	/	/	/	+
c8orf55 (8q24.3)	/	-	/	/	/
ETS1 (11q24.3)	/	-	-	-	/
FLI1 (11q24.3)	-	/	/	/	/
ETS2 (21q22.2)	+	+	+	+	+
ERG (21q22.2)	--	-	+	/	+

Les caractères / indiquent qu'il n'y a pas de différence d'expression significative par rapport à l'ARN référence

Les caractères + indiquent qu'il existe une sous expression significative par rapport à l'ARN référence

Les caractères - indiquent qu'il existe une sur expression significative par rapport à l'ARN référence

Tableau 24 - Expression des gènes candidats des RMC gagnées dans 7 p-LAM de la série étudiée par aCGH 244 K

	p-21	p-11	p-33	p-5	p-28	p-16	p-3
HOXA6 (7p15.2)	/	/	/	/	/	/	/
HOXA7 (7p15.2)	+	/	++	/	+	/	-
HOXA9 (7p15.2)	++	/	+++	/	+++	/	+
HOXA10 (7p15.2)	+	/	++	/	+	/	/
PSCA (8q24.3)	/	/	/	+	+	/	+
c8orf55 (8q24.3)	-	/	/	-	-	/	/
ETS1 (11q24.3)	/	-	/	-	/	++	/
FLI1 (11q24.3)	/	+	/	/	/	/	/
ETS2 (21q22.2)	+++	/	++	+	+	+	+
ERG (21q22.2)	+	+	/	/	-	+	/

Les caractères / indiquent qu'il n'y a pas de différence d'expression significative par rapport à l'ARN référence

Les caractères - indiquent qu'il existe une sous expression significative par rapport à l'ARN référence

Les caractères + indiquent qu'il existe une sur expression significative par rapport à l'ARN référence

XIV. ETUDE DES miRNA

On a vu parmi les RMC l'existence de miRNA et l'on discutera de leur implication dans les mécanismes possibles entrant dans la leucémogénèse.

Les résultats préliminaires de l'étude des miRNA montrent une différence de nombre de miRNA entre les p-LAM et les t-LAM : ils sont plus nombreux dans les cas de p-LAM comparativement à de la moelle normale (voir tableau 25).

Aucun de ces miRNA ne figure dans les RMC.

Tableau 25 - miRNA exprimés dans les p-LAM et les t-LAM

miRNA	p-LAM	t-LAM
miR-16	miRNA présents dans la série et up- régulés	miRNA non retrouvés dans la série
miR-181c	miRNA présents dans la série et up- régulés	miRNA non retrouvés dans la série
miR-221	miRNA présents dans la série et up- régulés	miRNA présents dans la série et up- régulés
let-7f	miRNA présents dans la série et up- régulés	miRNA non retrouvés dans la série
let-7a	miRNA présents dans la série et up- régulés	miRNA non retrouvés dans la série
miR-222	miRNA présents dans la série et up- régulés	miRNA non retrouvés dans la série
let-7e	miRNA présents dans la série et up- régulés	miRNA non retrouvés dans la série
miR-146a	miRNA présents dans la série et up- régulés	miRNA non retrouvés dans la série
miR-181b	miRNA présents dans la série et up- régulés	miRNA non retrouvés dans la série
miR-181a	miRNA présents dans la série et up- régulés	miRNA non retrouvés dans la série
miR-196b	miRNA non retrouvés dans la série	miRNA présents dans la série et up- régulés



miRNA présents dans la série et up- régulés



miRNA non retrouvés dans la série

DISCUSSION

I. ECHEC DE LA CULTURE DES FIBROBLASTES MEDULLAIRES

Cette partie du projet a été abandonnée car aucune culture n'a pu aboutir. On peut supposer que les cellules du stroma médullaire tout comme les cellules hématopoïétiques ont subi des remaniements qui les empêchent d'avoir un comportement normal (cycle cellulaire, adhérence...). Peu d'articles soulèvent ce problème. Il a été montré que la prolifération de fibroblastes issus de moelle leucémique était conséquente s'il s'agit de LAM plutôt que de leucémie lymphoblastique [Lieberman D, 1984]. Cette prolifération était proportionnelle au nombre de colonies de progéniteurs GM-CFC et inversement [Lieberman D, 1984 ; Gordon MY, 1983].

II. UTILISATION DE L'aCGH 244K ET DE L'aCGH 2x400K

L'analyse méthodique et minutieuse des résultats des variations de signaux (exprimés en logarithme) a permis d'en distinguer beaucoup plus par les lames contenant 400K oligonucléotides. La quantité de variations détectées par celles-ci est supérieure. Cependant, les CNV y sont bien plus dénombrés et de nombreux segments sont non codants. Les anomalies aux points de cassure des translocations dites équilibrées ne sont pas plus visibles en augmentant le niveau de résolution mais le nombre de patients étudiés avec ces puces est petit. La possibilité de détecter des CNA significatives est similaire entre les 2 types de lames. L'utilisation des micromatrices de 244K oligonucléotides semble suffisante pour analyser les leucémies, qui le plus souvent ne présentent pas autant d'anomalies que les néoplasies solides. L'idéal serait peut-être de développer des puces 2x244K qui permettraient de traiter simultanément 2 patients. Cependant des puces de résolution de 1 Mb sont en cours d'évaluation pour s'assurer que l'on puisse s'affranchir des problèmes de segmentation lors de l'analyse des puces telles que les 2x400K.

III. LES COPY NUMBER VARIATIONS (CNV)

III.1. Les CNV constitutionnels

L'utilisation d'un pool d'ADN commercial normal comme ADN témoin conduit à trouver des CNV tout le long du génome aussi bien en perte qu'en gain. Ces CNV sont communs à toute la série et sont donc facilement détectés par l'identité des bornes de début et de fin chez tout ou partie des malades. Les mêmes CNV sont vus en aCGH 244K et 2x400K. Ils sont reportés pour la plupart dans le tableau 10A. Ces « résultats » ont été séparés aisément de l'ensemble des résultats des CNA.

Bien qu'ils soient identifiés comme polymorphismes, des CNV peuvent être considérés comme des co-facteurs de susceptibilité aux processus malins [Skjelbred CF, 2007 ; Suzen HS, 2007 ; Sreeja L, 2008].

G. Leone [Leone G, 2007] reprend dans sa revue de la littérature des arguments montrant que la variation de CYP3A4 peut affecter la capacité du système CYP à transformer les épipodophyllotoxines en un métabolite catéchol qui peut induire des dommages à l'ADN.

De même, la capacité de l'inactivation de plusieurs cytotoxiques par le système GST peut être de moins bonne efficacité selon le polymorphisme. Ainsi Davies et al [Davis SM, 2001] avait expliqué 10 ans auparavant que la délétion de GSTT1 chez des enfants traités pour une LAM provoquait une plus grande toxicité de la chimiothérapie et exposait à une moins bonne survie.

D'autres équipes, dont celle de Leone ne trouvent pourtant pas de différence de prévalence entre les groupes de patients p-LAM et t-LAM pour cette délétion de GSTT1. Dans le présent travail, 25% de la population t-LAM présente une délétion de GSTT1 contre 8,5% dans la population p-LAM. Il est envisageable de penser qu'il existe un ou des facteurs de susceptibilité de type CNV dans les t-LAM.

L'équipe de Wong [Wong KK, 2007] rapporte dans un tableau 42 régions de CNV qui comprennent des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur laissant penser que de tels gènes jouxtent des régions soumises à des variations [voir copie du tableau de son article en annexe].

Ce même auteur soulève le problème de l'existence de miRNA situés dans les loci CNV et pose la question de leur rôle précisément dans ces régions. Son travail a trouvés 14 miRNA dans cette situation. Dans le tableau 6 du présent travail, on relève parmi les CNV les plus fréquents 4 miRNA.

III.2. Les CNV acquis

On trouve près d'un quart (8/36) de la population t-LAM avec un réarrangement VDJ des immunoglobulines. Ces réarrangements ont été décrits [Schmetzer HM, 2000 ; Roumier C, 2003] et sont souvent associés avec un réarrangement du gène *MLL* [Dupret C, 2005]. De plus le travail de Toujani et al [Toujani S, 2009] montre qu'au sein de quasiment toutes les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt, les réarrangements des IgK en 2p11.2 et 14q32.3 existent. Ainsi, la possibilité qu'il y ait des réarrangements acquis des séquences VDJ des immunoglobulines peut faire discuter du faible degré de différenciation des cellules leucémiques et de leur caractère multipotent.

IV. LES COPY NUMBER ABNORMALITIES (CNA)

Les anomalies chromosomiques acquises connues des LAM, mises en évidence au caryotype lors du diagnostic, sont dans l'ensemble, similaires dans le présent travail (chromosomes 5 et 7, translocations, réarrangement en 11q23...). L'aCGH HR permet de trouver les mêmes anomalies de départ si les pré-requis sont respectés. Comme retrouvées dans la littérature, [Schoch C, 2002] les pertes de CNA sont plus fréquentes que les gains dans les t-LAM et p-LAM.

On compte plus de CNA dans les t-LAM que dans les p-LAM (131 versus 108) avec une moyenne de 3,6 CNA par patient t-LAM et 2,3 par patient p-LAM [Schoch C, 2002 ; Parkin B, B 2010 ; Parkin B, 2010, Walter MJ, 2009]. En outre on compte également plus de t-LAM avec un caryotype MK (5 cas contre 1 cas dans les p-LAM). La plupart de ces cas de t-LAM présente surtout un caryotype complexe. Les 5 cas t-LAM présentent d'ailleurs les mêmes CNA trouvés

par l'équipe de Rucker lors d'un travail combinant la cytogénétique à la recherche de caryotype complexe avec un MK, l'aCGH et les mutations de *TP53* [Rucker, 2012].

Dans la moitié des cas de t-LAM, des anomalies infracytogénétiques ont été révélées par aCGH. Il y a deux fois moins d'anomalies cryptiques dans les p-LAM à caryotype normal. En outre, le nombre d'anomalies dans les p-LAM est majoré par le nombre de caryotypes très complexes, ce qui laisse penser que ces anomalies vues en aCGH en sont d'autant réduites si l'on retirerait l'hypercomplexité. Ainsi, les CNA sont plus représentées dans les t-LAM. Ces résultats coïncident avec l'implication des médicaments cytotoxiques comme agents mutagènes dans la leucémogénèse des t-LAM.

Dans tous les cas et quelque soit le niveau de résolution de l'aCGH, les translocations équilibrées restent indétectables. Il n'y a pas d'observation de délétion ou d'amplification aux points de cassure sauf dans 2 cas où il existe une translocation t(8;21). Dans le cas du patient t-12 celui ci présente aussi une trisomie 21 partielle et distale qui débute en 5' du gène *RUNX1* (position 35,05 Mb) : celle-ci a été confirmée par une FISH qui révèle une translocation déséquilibrée en distalité du 21q vers un chromosome non identifié dans plus de la moitié des métaphases. Dans le cas du patient p-18, il existe une perte en 8q21.3 emportant les premiers exons en 5' du gène *RUNX1T1*. Il est possible que le gène chimère issu de cette translocation soit une forme variante dite « tronquée » et peut être responsable du processus tumoral [Yan M, 2004].

Ainsi, les mécanismes impliqués dans cette translocation (8;21) semblent différents entre ce cas de t-LAM et celui de p-LAM.

V. LES REGIONS MINIMALES CRITIQUES (RMC)

Quatorze RMC sont trouvées parmi les 36 cas de t-LAM et 9 parmi les 47 cas de p-LAM (tableaux 11 et 12). Une RMC est commune aux 2 groupes de leucémies, toutes 2 centrées sur le gène *RUNX1*. La plus petite RMC est de 0,02 Mb dans le groupe des t-LAM.

On trouve 8 RMC de taille inférieure à 2 Mb contre 3 dans les p-LAM. La RMC la plus longue est retrouvée dans le groupe des t-LAM en 17q de 55,85 Mb.

Ces RMC contiennent probablement des gènes candidats mais aussi des miRNA (on en compte 22 dans les t-LAM et 12 dans les p-LAM (voir tableaux 15 et 16)) qui ont vraisemblablement une implication dans le processus malin. Ces derniers sont d'ailleurs décrits comme pouvant être impliqués dans l'hématopoïèse [Chen CZ, 2004 ; Karp X, 2005] mais aussi dans l'oncogénèse en agissant sans doute comme suppresseurs de tumeur ou des oncogènes en fonction de leur niveau d'expression [Karp X, 2005 ; Garzon R, 2006 ; Dixon-McIver A, 2008]. Dans sa revue, Havelange [Havelange, 2009] montre que les miRNA sont probablement impliqués dans la leucémogénèse et auraient un impact pronostique. Par ailleurs, il existerait une relation entre le gène *MLL*, les gènes *HOX* et *mir-196b* avec une surexpression de ce miRNA lorsque *MLL* est remanié.

L'ensemble des RMC générées par le présent travail doit être également exploité en l'intégrant dans un tableau global provenant d'un recueil de données publiées de plusieurs séries de LAM étudiées par puces ADN (de plusieurs types) en ne choisissant pas des données provenant de case report. [Akaji T, 2009 ; Akaji T, 2009 ; Parkin B, 2010 ; Parkin B, 2010 ; Paulsson K, 2006; Rucker

FG, 2006; Suela J, 2007; Tyybakinoja A, 2007; Walter MJ, 2009].

Dans le tableau 26 (A et B), on pourra voir qu'il existe des RMC identiques ou que l'on peut inclure dans ces résultats. D'autres RMC sont bien distinctes et assez nombreuses. Il est bien entendu que les localisations diffèrent de quelques kilobases en fonction, essentiellement, de l'année de la classification NCBI (pas toujours précisée dans les articles) et des techniques utilisées (aCGH, SNP). Toutefois, cela a permis d'étudier 634 cas de p-LAM et 56 cas de t-LAM (résultats du présent travail inclus). Pour ce tableau global (tableaux 26A et 26B), il a été délibérément choisi de s'aligner sur la classification NCBI 36/hg18 de mars 2006 comme les résultats présentés pour l'ensemble des séries étudiées.

Une fois de plus on s'aperçoit que le nombre de RMC perdues est supérieur à celui des RMC gagnées. Tout type de LAM confondu, on compte 123 RMC perdues dont 34 parmi les t-LAM, contre 51 gagnées dont 4 parmi les t-LAM.

On choisit, pour poursuivre la discussion, de prendre comme fil directeur ce tableau 26. On s'attachera à différentes RMC présentées dans ce travail pour considérer différents gènes d'intérêt qui sembleraient être impliqués dans la leucémogénèse. Ces gènes une fois notés pourraient représenter à eux seuls un nouveau projet de recherche (séquence, fonction, expression).

V.1. RMC -1q

La perte en 1q44 est juxta-téломérique. Elle n'est pas décrite dans la littérature. Parmi la vingtaine de gènes qu'elle contient, *SMYD3* paraît intéressant : il est exprimé dans les cellules CD 34+ et code pour une histone méthyltransférase qui est impliquée dans la régulation transcriptionnelle.

V.2. Deux RMC -3p

La perte en 3p21.3 contient plus d'une trentaine de gènes sans pouvoir sélectionner lesquels pourraient être candidats. On pourrait soulever l'hypothèse que cette région, riche en Zinc Fingers, ait des interactions importantes avec différents partenaires moléculaires. En revanche, elle apparaît aussi bien dans les p-LAM que dans les t-LAM.

La perte en 3p14.1 n'est trouvée que dans des t-LAM. Les 2 patients du présent travail présentant cette anomalie ont tous 2 reçus du 5FU et de la radiothérapie. Il est possible que l'un de ces traitements ou l'association des deux entraîne cette anomalie de 10 Mb. Dans cette RMC, on retient le gène *PROK2* (prokineticin 2 isoform) qui code pour une protéine qui se lie à un récepteur couplé à une protéine G et serait impliqué dans l'angiogénèse [Monnier J, 2010] et les cancers, notamment de la thyroïde via la voie BRAF [Pasquali D, 2011].

Un autre gène semble être intéressant : *SHQ1*, également exprimé dans les cellules CD 34+ qui participe à l'assemblage de la H/ACA box dans le nucléole. Il permet aussi la stabilisation des télomérases.

V.3. RMC -4q

Cette perte n'est observée que dans les p-LAM (tableau 26A) et elle contient le gène *TET2*. La mutation de ce gène est récemment décrite. Il est impliqué dans les hémopathies myéloïdes [Tahiliani M, 2009] et est retrouvé dans 8 à 20% des p-LAM [Kosmider O, 2011]. Kosmider a étudié 201 LAM post SMD (MRC-AML) et 46 t-LAM : il est relevé que le nombre de mutations de *TET2* est seulement de 8% dans les t-LAM contre 22% dans les MRC-AML. L'ensemble de ces résultats laisse suggérer que *TET2* n'est pas un gène impliqué directement dans les leucémies induites.

V.4. Des RMC -5q

Cette région est sujette à beaucoup de publications car c'est une des anomalies déséquilibrées les plus récurrentes dans les myélodysplasies et les LAM et d'autant plus dans les t-LAM secondaires aux agents alkylants.

Dans le tableau 26A, on s'aperçoit que le bras long du chromosome 5 est découpé en 12 RMC de différentes tailles. Au sein des p-LAM, les régions les plus fréquemment concernées semblent être situées entre 86,54 Mb et 114,14 Mb. Les résultats du travail actuel n'ont pas permis de trouver une CNA dans ces régions.

La première RMC contient *RASAI* qui intervient dans la voie RAS en ayant une activité suppresseur de tumeur [Hu X, 2009] et une mutation de ce gène est associée à des carcinomes épithéliaux et à des cancers du sein.

Dans la seconde RMC, on retrouve les gènes *APC* et *MCC* bien connus dans les carcinomes recto-coliques. On note aussi le gène *PCSK1* qui pourrait être impliqué dans l'oncogenèse [Stockwin LH, 2009].

L'équipe de Lai en 2001 [Lai F, 2001] avait délimité une région d'environ 1 Mb comprenant près d'une vingtaine de gènes. En remplaçant cette région selon la NCBI 36, on délimiterait cette région entre 136,33 et 137,86 Mb en 5q31.2. On ne retrouve pas cette région dans le tableau 26A. MacKinnon [MacKinnon RN, 2011] publie un case report limitant cette région entre 137,78 et 139,02 Mb (selon, vraisemblablement une autre classification NCBI). Le gène candidat de cette région serait *EGR1* (Early Growth Response 1). *EGR1* joue un rôle de facteur régulateur transcriptionnel. Il a été démontré dans des souris que la perte d'un seul allèle de *Egr1* suffit pour une prédisposition à une transformation maligne myéloïde car en recevant un agent alkylant, les souris *Egr1*^{+/-} développent une myéloprolifération [Joslin JM, 2007]. Toutefois, aucune série rapportée dans le tableau 26A n'aboutit à cette région. Il serait intéressant de savoir qu'elle pourrait être la fréquence de cette perte dans la population des patients atteints de t-LAM, avec par exemple des grands 5q- ou des -5.

L'exemple de *EGR1* souligne les incertitudes dues aux versions successives de la carte du génome. *EGR1* n'est probablement pas un gène agissant de façon isolée dans le segment 5q. Il est probable que plusieurs gènes jouent un rôle différent sur le 5q ce qui pourrait rendre compte de l'absence de RMC unique.

Les RMC des t-LAM semblent plus distales sur le bras long du chromosome 5. Deux RMC, présentes dans plus de 10% des t-LAM rapportées, sont par ailleurs plus proximales que celle publiées par Evers [Evers C, 2007]. La région de 0,74 Mb contient plusieurs gènes candidats comme le *CDKL3* (anciennement *NKIAMRE*). La perte de *CDKL3* a été montrée par l'équipe de Midmer [Midmer M, 1999] comme un gène impliqué dans la dysmyélopoïèse. Un autre gène, *UBE2B*, est nécessaire pour la phase post répliquative après la réparation de brins d'ADN endommagés.

Beaucoup de travaux désignent encore à l'heure actuelle, plusieurs régions en 5q, de taille plus ou moins petite, mais aujourd'hui encore aucun gène candidat n'est clairement identifié comme tel. La comparaison des fréquences de ces différentes régions semblent toutefois montrer que certaines sont plus présentes dans les t-LAM que dans les p-LAM et inversement. On peut discuter d'un mécanisme altérant des facteurs transcriptionnels dans les t-LAM compte tenu des gènes présents dans leur RMC. Dans les p-LAM, on peut aussi émettre l'hypothèse d'un mécanisme d'altération de gènes suppresseurs de tumeur.

Par ailleurs, on retrouve également de nombreuses références portant sur le syndrome 5q- qui est un syndrome myélodysplasique décrit depuis 1974 par Van den Berghe. Il ne semble pas qu'il y ait aujourd'hui de cas typique de ce syndrome dans les t-SMD. Ce syndrome est caractéristique avec un phénotype particulier et est connu pour avoir un pronostic plutôt favorable. Il s'agit d'une délétion située en 5q32 mesurant 1,5 Mb bornée par les gènes *D5S413* et *GLRA1* révélés par Boulwood [Boulwood J, 2002].

Dans cette région, un gène notamment, apparaît comme un gène candidat car il peut être frappé d'haploinsuffisance : le gène ribosomal *RPS14*. Sa perte partielle de fonction provoque, dans les cellules CD34+, un blocage de la différenciation de la lignée érythroïde. A l'inverse, en restaurant l'expression de *RPS14* dans des cellules atteintes du syndrome 5q-, on peut redonner à ces cellules un phénotype normal [Ebert, *Nature*, 2008, 451:335-339]. De plus l'haploinsuffisance de *RPS14* active la p53 dans la lignée érythroïde [Dutt, *Blood*, 2011]. D'ailleurs Ebert distingue clairement la région 5q32 de la région 5q31.2 contenant d'autres gènes candidats tels que *CTNNA1*, *EGR1* et *CDC25C*. *CTNNA1* est moins exprimé dans les cellules CD34+ des LAM avec une délétion de 5q et serait considéré comme un gène suppresseur de tumeur.

V.5. RMC du chromosome 7

V.5.1. RMC en -7p

Cinq patients t-LAM de ce travail ont permis de délimiter en aCGH, une RMC de 90 Kb auxquels s'ajoutent 5 autres patients t-LAM trouvés dans la littérature. Cette région contient *CARD11* qui est perdu en 7p22.2. Un case report de 2009 retrouve aussi en aCGH une perte en 7p22.3p12.1 chez un patient présentant une p-LAM avec au diagnostic un caryotype 46,XY,-7,+mar [20] [Woo KS, 2009]. On pourrait émettre l'hypothèse que la perte de ce gène serait responsable d'une altération d'un mécanisme dépendant de l'apoptose : *CARD11* fait partie, des caspases activant la voie NFκB et induisant la phosphorylation de Bcl 10 dans les cellules CD34+ [Staudt LM, 2010]. Aucune description n'a encore été faite concernant *CARD11* dans les

myéloproliférations ce qui n'est pas le cas dans certains lymphomes via le complexe CARD11-BCL10-MALT1 [Ferch U, 2009].

V.5.2. RMC en +7p

Une seconde RMC, en 7p15 est cette fois retrouvée gagnée et uniquement dans le travail présent : 4 patients t-LAM expose ce même gain. Cette région contient plusieurs gènes de la famille *HOXA* (tableau 15 et 26B). La première question posée était de s'assurer que l'on n'était pas confronté à un CNV (voir annexe figure 7). Bien que l'on observe 2 CNV gagnés pour cette région dans la data base de Toronto, on note cependant que parmi les 5 patients t-LAM, 3 ont reçu une radiothérapie, 4 ont reçu une association ATII/AA. Il est possible que l'agent inducteur de cette anomalie à considérer comme un CNA, soit de type AA ou assimilé comme AA comme la radiothérapie.

La famille *HOXA* est un ensemble de gènes codant des facteurs transcriptionnels qui jouent un rôle important dans le développement de la segmentation de l'embryon et dans la survie des cellules hématopoïétiques. *HOXA6* est directement impliqué dans le processus du développement des cellules progénitrices hématopoïétiques. *HOXA9* est souvent un partenaire de fusion avec *NUP98* dans certaines LAM [Huret JL Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol] et est fondamentalement impliqué dans les LAM de souris transgéniques [Golub TRr, 1999; Thorsteinsdottir U, 2002 ; Eklund EA, 2007]. Il faut noter que ces gènes appartiennent au groupe *HOXA5-11* et exprimé dans le compartiment des CD34+ [Sauvageau SA, 1994 ; Kawagoe H, 1999].

Comme on peut s'y attendre, le patient t-19 avec une translocation t(9;11)(p21;q23) a ce gain en 7p15.2. En effet, les LAM avec un remaniement de *MLL* ont une surexpression des gènes Abd-B *HOXA* [Quentmeier H, 2004]. Le patient t-pio présente quant à lui une quadruplication de *MLL*. Les autres cas de t-LAM formant cette RMC ne présentent pas de similitudes cytogénétiques. On relève aussi qu'il n'y a aucune description de cette anomalie dans les p-LAM.

III.5.3. Région -7q

Comme le 5q, la perte du bras long du chromosome 7 dans les SMD et les LAM est récurrente. L'anomalie du chromosome 7 (-7 ou del(7q)) est induite dans les t-LAM par les agents alkylants. Selon les connaissances actuelles, aucune région spécifiquement délimitée en 7q n'a permis de pointer des gènes candidats.

Un premier regard sur le tableau 26A suggérerait que les RMC, entre les p-LAM et les t-LAM sont communes et représentées avec une même fréquence. Cependant, 4 RMC se distinguent plutôt dans les t-LAM parmi les 8 retrouvées dans la littérature (en y incluant celles trouvées dans les cas étudiés ici).

La première se situe en 7q21.1, de 230 Kb, ne contenant qu'un seul gène, *PFTK1*, (PFTAIRE protein kinase 1) aussi appelée *CDK14* (cyclin dépendant kinase). Ce gène code pour une protéine qui est impliquée dans la voie de signalisation Wnt, intervenant dans le cycle cellulaire et dans la prolifération du cancer colique [Gwak J, 2009].

La seconde RMC se situe en 7q21.3q22.1, mesurant 2,67 Mb et contenant plus d'une quarantaine de gènes et 4 miRNA (miR-25, miR-93, miR-106b et miR-5480). Parmi ces gènes, 4 attirent l'attention : *TRRAP*, *BUD31*, *ZNF394* et *MCM7*, tous bien exprimés physiologiquement dans la moelle osseuse, surtout *MCM7*. D'ailleurs, il a été récemment publié par Wang [Wang J, 2011] que miR-93 est co-exprimé avec son gène hôte, *MCM7*, dans la différenciation des cellules monocytiques. *MCM7* est en outre, impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire [Blow JJ, 2002].

Le gène *TRRAP* (transformation/transcription domain associated) est normalement exprimé dans les cellules CD34+. Des cellules déficitaires de *Trapp* ont une capacité à réparer l'ADN de façon moins rapide que les cellules sauvages [Murr R, 2006]

Le gène *BUD31* est aussi appelé G10 protein. On peut supposer l'intervention de ce gène dans une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant ou complétant un mécanisme leucémogène.

Enfin, *ZNF394* est globalement très exprimé dans la moelle. C'est une protéine hypothétique, probablement, avec un domaine zinc finger pouvant interagir avec l'ADN.

La troisième RMC, en 7q33q34, de 1,74 Mb contient 5 gènes et un miRNA, miR-490. L'expression de ce micro-RNA a été récemment montrée down-régulée dans les cancers de la vessie [Han Y, 2011]. Parmi les 5 gènes de cette région, on pourrait retenir *CRB3L2*. C'est un facteur transcriptionnel rencontré dans les fibrosarcomes avec la translocation t(7;16)(q34;p11) lui procurant comme partenaire de fusion *FUS* [Panagopoulos I, 2004] mais également *PPAR γ* dans les cancers de la thyroïde avec la translocation t(3;7)(p25;q34) [Lui Wo, 2008]

Enfin, la quatrième RMC se situe en 7q31.3 de 2,2 Mb et contient 13 gènes connus dans la RefSeq data base, mais la plupart sont habituellement peu exprimé dans la moelle osseuse ne laissant pas suggérer un rôle capital dans la leucémogénèse.

Au total, on retiendra l'hypothèse qu'il y a probablement plusieurs mécanismes liés à la délétion du bras long du chromosome 7 et que les AA induisent plus d'anomalies entre les bandes q21.1 et q33. Il est à noter que le gène *EZH2* (histone méthyltransferase gene), récemment isolé dans des SMD par UPD [Quentin S, 2011] n'est pas inclus dans les RMC des t-LAM.

V.6. RMC +8q24.3

C'est une région gagnée de 170 Kb, plutôt décrite dans les t-LAM (tableau 26B) dont les bornes sont délimitées par 2 cas de t-LAM de ce présent projet. Ce qui est frappant c'est qu'elle ne contient pas *MYC* et *TRIB1* puisque ces oncogènes sont plus proximaux de celle-ci. Ceci a déjà été décrit par Storlazzi [Storlazzi, 2006] qui met en évidence, en utilisant un modèle épisomal (modèle délétion-plus-épisode), que *MYC* n'est pas exprimé dans 32 cas de LAM et 2 cas de SMD présentant une amplification de 8q24 associée à des doubles minutes. La conclusion de son travail était que *MYC* n'était pas le gène cible de cette amplification.

En revanche, cette région contient plusieurs gènes susceptibles d'être impliqués dans un processus malin. *PSCA* (Prostate Stem Cell Antigen) est connu pour être impliqué dans les cancers de la prostate mais aussi dans la susceptibilité de ce cancer et de cancer de l'estomac selon certains types de polymorphismes [Song HR, 2011; Joung JY, 2011]. De plus *PSCA* est exprimé dans les cancers de la prostate lorsque *MYC* est amplifié [Reiter RE, 2000].

L'attention est également attirée sur le gène *C8orf55* appelé aussi Mesenchymal stem cell protein DSCD75, qui a habituellement une expression basale dans la moelle osseuse. Récemment, une équipe japonaise [Suzuki K, 2011] a démontré, à partir d'un modèle murin que les cellules mésenchymateuses sont capables de promouvoir la croissance de cellules tumorales aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* et qu'il est probable que cette prolifération cellulaire *in vivo* soit en partie médiée par l'angiogénèse.

V.7. RMC +11q24.2q24.3

Dans notre série, seul un patient t-LAM présente une amplification de cette région mais elle fait partie d'un grand segment amplifié depuis 11q14.3 jusqu'à 11q25 <91,74-134,45>.

Toutefois, on note qu'au sein de ces 42,71 Mb, 6 segments ont un ratio linéaire d'amplification très fort (supérieur à 3) (voir figure 6).

Parmi ces 6 segments on peut relever celui qui est le plus amplifié (ratio égal à 3,28). Il contient le gène *GRIA4* (glutamate receptor ionotropic AMPA4 isoform) essentiellement exprimé dans le système nerveux et sous exprimé dans la moelle osseuse. C'est un gène qui serait soumis à une hyperméthylation dans les lymphomes non hodgkiniens folliculaires [Benett LB, 2009].

Le second segment (ratio égal à 3,23) est plus distal (<133,82-134,38>). Il ne contient pas de gène connu.

Il existe un segment s'étendant de 117,45 à 131,14 Mb. Sa portion proximale contient le gène *MLL* et en distal les gènes *ETS1* et *FLII*. Dans la littérature, 11q24.2q24.3 est retrouvée amplifiée dans plus de 5% des cas de p-LAM. Deux gènes y apparaissent intéressants : *ETS1* et *FLII*. Ces deux gènes font partie de la famille Ets.

ETS1 (Erythroblastosis virus E26 oncogene) a été découvert en premier par Stehelin dans les années 80 [Leprince D, 1983] en étudiant le virus E26. On sait, notamment, depuis 1990, [Papavas TS, 1990] que la famille Ets est impliquée dans les leucémies par les gènes *ETS2* et *ERG* (situés en 21q22, sujet développé plus loin dans la discussion). Comme tous les membres de cette famille, *ETS1* et *FLII* ont une place importante dans la régulation de l'hématopoïèse, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Il faut noter que ces gains sont décrits concomitamment avec les gains de *ETS2* et *ERG* au sein de LAM à caryotype complexe.

FLII (Friend Leukemia virus Integration) est un partenaire de fusion de *EWS* dans les sarcomes d'Ewing. La protéine chimère utilise le site DNA-binding, activateur transcriptionnel de *FLII*. Ainsi, les cibles de *EWS-FLII* sont des molécules de régulation des voies de

signalisation et du cycle cellulaire [Erkizan HV, 2010]. De plus, la similitude entre *FLII* et *ERG* semble majeure, si bien que les translocations mettant ensemble *EWS* et *FLII* et *EWS* et *ERG* aboutissent aux mêmes caractéristiques phénotypiques dans les sarcomes d'Ewing [Ginsberg JP, 1999]. Un travail franco-australien a mis en évidence que *Fli1* et *Erg* sont des facteurs transcriptionnels qui interviennent dans l'hématopoïèse et notamment dans la lignée mégacaryocytaire en étudiant des colonies de progéniteurs médullaires de souris *Erg^{+/Mld2}* et de souris *Fli1^{+/-}* qui présentent une diminution du nombre de progéniteurs lorsque la souris associe les 2 mutations [Kruse EA, 2009].

Ainsi on peut comprendre qu'une amplification du gène *FLII* et des gènes de la famille Ets soit un phénomène important dans la leucémogénèse.

D'autre part, il a été récemment montré que *miR-145* est sous exprimé dans les cancers coliques lorsque *FLII* est surexprimé. On soumet ainsi l'hypothèse que *miR-145* agirait comme un suppresseur de tumeur par sa liaison à la région 3'UTR (untranslated region) de *FLII* [Zhang J, 2011].

En 2000, Zochodne publiait [Zochodne B, 2000] que la surexpression de *Fli1* dans les érythroblastes bloquait la différenciation érythrocytaire, aboutissant à une LAM 6. Cette surexpression est associée à une activation de la voie Shi/Ras lorsque l'EPO est ajoutée au milieu de culture. L'auteur précise que *SHIP-1* (Src homology domain containing inositol -5-phosphatase 1) est associé à la partie phosphorylée dans ces mêmes LAM 6 après stimulation par l'EPO. Une équipe canadienne a d'ailleurs utilisé un modèle murin avec *F-MulV* (Friend murin leukemia virus) induisant une LAM 6 pour démontrer que *Fli1* initie la prolifération et l'activation, via l'utilisation de l'EPO, de la voie ERK/MAPK et PI3K (voir figure 8). *SHIP1* est la cible directe de *FLII* qui agit par rétrocontrôle négatif et favorise la prolifération cellulaire.

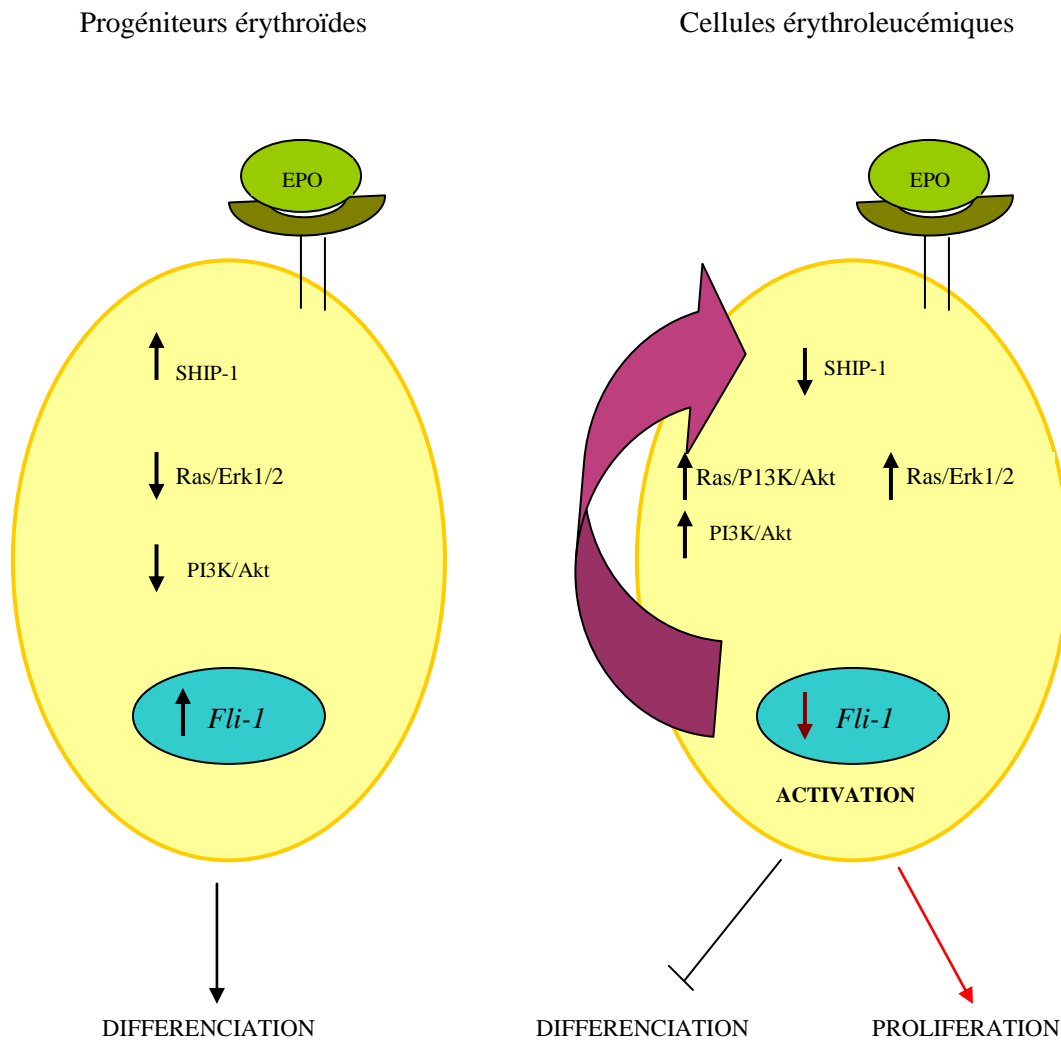
Enfin on peut relever aussi le segment localisé en <107,49-108,64> qui contient les gènes *NPAT* (nuclear protein ataxia telangiectasia locus) et *ATM*. *NPAT* intervient dans la progression de la phase G1 vers la phase S et l'entrée du cycle cellulaire en phase S ; *ATM*, check point important dans le cycle cellulaire et régule p53 et BCRA1, CHK2, RAD17, RAD9 et la protéine de réparation de l'ADN, NBU1.

ATM est connu pour son implication à la fois dans l'ataxie télangiectasie et dans l'anémie de Fanconi. Dans la première pathologie il s'agit d'une réponse inadaptée au stress oxydatif, dans la seconde, lors de radiations ionisantes. Il existe un défaut de réparation de l'ADN et un passage via le checkpoint de la phase S [Castillo P, 2011]

Dans le cas du patient avec amplification, t-pio, on peut faire l'hypothèse d'une surexpression du gène « moteur » et pas d'une inhibition.

Le gène *NPAT*, est impliqué dans l'activation des gènes histone H4 lors de la transition de la phase G vers la phase S [Stein GS, 2006]. L'étude de l'expression de ces gènes par puce ADN chez ce patient serait nécessaire pour restreindre le nombre de gènes candidats.

Figure 8 - Modèle de la boucle de rétrocontrôle négatif de Fli-1 et de SHIP-1.



Lors de la différenciation induite par l'EPO, l'expression de SHIP-1 est élevée et permet de réguler négativement la voie PI3-K/Akt et l'expression de FLI-1 est la plus basse. Sous l'activation de FLI-1, par une mutagenèse insertionnelle, les voies PI3-K/Akt et Ras/MAPK sont activées. L'accroissement de l'activité d'Akt via PI3-K et/ou Ras/PI3-K/Akt va permettre une augmentation de la transcription de *fli-1* ; ceci va conduire au blocage de la différenciation et accélérer la prolifération par l'EPO. Au fur et à mesure que le niveau de Fli-1 croît, la transcription de *SHIP-1* est largement supprimée ; il est possible qu'au stade de LAM6, la répression de *SHIP-1*, soit complète.

Lakhanpal GK, Vecchiarelli-Federico LM, Li YJ, et al. *Blood* 2010, 116(3), 428-436

V.8. RMC -12p13

C'est une RMC de moins de 1,5 Mb dont les limites sont apportées par 4 t-LAM (dont 2 du présent travail). Cette perte est commune aux 2 types de LAM mais est plus fréquente dans les t-LAM.

Une fois encore on trouve dans cette région un membre de la famille Ets : il s'agit de *ETV6* (Ets variant 6).

ETV6 comporte 2 domaines fonctionnels. Le premier est en N-terminal impliqué dans les interactions protéine-protéine et avec lui-même ; le second est en C-terminal site de liaison à l'ADN.

Il a été identifié dans les années 90 dans des cas de LMMC présentant une translocation t(5;12)(q33;p13) [Golub TR, 1994]. On l'a depuis rencontré dans bien d'autres néoplasies solides ou hématologiques. Lorsque des cellules ES TEL^{-/-} ont été transférées dans des blastocystes murins, on s'est aperçu que *ETV6* est nécessaire dans l'hématopoïèse post natale [Wang LC, 1998].

En ce qui concerne *ETV6* et les hémopathies, la bibliographie est riche et le choix se portera sur 4 publications récentes.

La première est produite par Bajaj *et al.* [Bajaj R, 2011] avec une analyse en aCGH 44K de 13 SMD et 14 LAM. Il retrouve plusieurs CNA dont la perte de 12p12.3 parmi 3 LAM et 2 SMD, tous présentant un caryotype complexe. La seconde publication est un cas de leucémie chronique à éosinophiles avec une t(12;15)(p13;q25) (chez un patient conjointement atteint d'un cancer pancréatique) [Forghieri F, 2011] permettant un réarrangement de *ETV6* avec le gène *NTRK3*, et la troisième publication est un cas de LAM0 avec la même translocation [Kralik JM, 2011]. Cette fusion peut concerner plusieurs types de processus malin tissulaire (fibrosarcome, néphrome mésoblastique, carcinome mammaire) laissant suggérer que toute fusion de gène n'est pas spécifique du type de tumeur [Lannon CL, 2005].

La quatrième publication rapporte un cas de translocation t(5;12)(q33;p13) dans un syndrome myéloprolifératif secondaire au traitement d'une LAM3. Le gène chimère associe *ETV6* à *PDGFRB* [Malfuson JV, 2011].

Un second gène est également présent dans cette région. Il s'agit du gène *CDKN1B* qui code pour la p27 qui surveille le cycle cellulaire pendant la transition phase G1 vers la phase S. Il y a une quinzaine d'années, il a été suggéré que p27 agissait comme un gène suppresseur de tumeur [Pietenpol A, Bohlander SK, Sato Y *et al.*, Cancer Res 1995] et il est rappelé que p27 jouait un rôle important notamment dans le cycle cellulaire des leucocytes. L'étude portait sur 45 patients présentant une hémopathie avec une anomalie en 12p. On comptait parmi ces patients 4 p-LAM, 2 t-LAM, 2 SMD (et 2 leucémies aiguës lymphoblastiques), tous avec un caryotype complexe et une mutation de p27 exclusivement de type délétion. La seule haploinsuffisance suffisait ainsi pour conférer à la cellule un avantage sélectif pour proliférer. Cinq ans plus tard une autre équipe [Stingerland J, 2000] confirmait aussi cette hypothèse. D'ailleurs c'est en étudiant 47 patients avec une anomalie en 12p que Sato *et al.* [Sato Y, 1995] a montré que la RMC en 12p13 a été définie bornée par les gènes *ETV6* et *CDKN1B*. Ce travail comprenait l'étude de 10 p-LAM, 4 t-LAM, 11 SMD et 3 t-SMD ; une fois de plus leur caryotype était complexe. Cette RMC contenait la perte de 12p13 à l'état hétérozygote, confortant ainsi la première hypothèse d'haploinsuffisance de p27 induisant l'entrée dans un processus malin, sans pour autant que la perte de 2 allèles soit nécessaire pour que *CDKN1B* perde sa fonction. La

réduction de 50% de p27 doit être suffisante pour entraîner un contrôle défaillant du point de passage de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire. Enfin, l'haploinsuffisance de ce gène a été également mise en évidence dans les leucémies aiguës prolymphocytaires T [Le Toriellec E, Despouy G, Pierron et al. *Blood* 2008].

V.9. RMC -17p13.2p13.1

Cette région contient un gène suppresseur de tumeur bien connu depuis plus de 30 ans, le gène *TP53* (tumor protein p53 isoform). La perte d'un gène suppresseur de tumeur est un mécanisme fréquent dans l'oncogenèse. Cette perte de *TP53* semble plus fréquente dans les t-LAM que dans les p-LAM (10% versus 3%). Aucun cas étudié dans la série des 82 patients n'a révélé cette perte. Pourtant cette fréquence est rapportée pour être aux alentours de 10% dans les LAM et les SMD [Wattel E, 1994 ; Haferlach C, 2008 ; Bejar R, 2011]

Pour mémoire, *TP53* code pour la protéine p53 qui répond à différents stress cellulaires en régulant des gènes cibles qui sont capables d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation de l'ADN et l'activité métabolique [Meek DW, 2009 ; Zilfou JT, 2009]. La perte de p53 provoque une instabilité génomique. Cette instabilité liée à la perte de p53 semble responsable en partie de l'existence des LAM à caryotype MK. Deux articles récents [Gaillard JB, 2012 et Rücker FG, 2012] montrent une association marquée entre caryotype MK et les mutations de *TP53* (plus de 50% des cas étudiés présentent une mutation de ce gène).

Il a été montré que des cellules déficitaires en p53 sont capables d'autorenouvellement [Tekippe M, 2003 ; Meletis K, 2006 ; Armesilla-Diaz A, 2009 ; Liu Y, 2009 ; Dumble R, 2007].

Dans les cellules normales, l'expression de p53 est basse. Dans les lignées cellulaires malignes des différents tissus, les mutations de *TP53* sont plus fréquentes et confèrent un statut de résistance aux traitements antinéoplasiques [Wattel E, 1994 ; Buttita F, 1997]. L'association perte de p53 et Ras a été montrée à plusieurs reprises dans les cellules cancéreuses [Sevignani C, 1998 ; Johnson L, 2001 ; Zuber J, 2009]. Récemment, l'association perte de p53 et présence de la mutation *Kras*^{G12D} a été montrée dans les cellules progénitrices myéloïdes les conduisant à proliférer de façon exagérée jusqu'à se transformer en cellules blastiques. Les LAM induites par cette association sont essentiellement assez différenciées. Ce travail suggère que l'autorenouvellement et la différenciation sont deux processus différents lors de la leucémogénèse [Zhao Z, 2010 ; Bejar R, 2011].

En 2011, il a été rapporté un cas de t-LAM après le traitement par chimiothérapie (comprenant des AA) et par radiothérapie d'un cancer mammaire. Cette t-LAM présentait au diagnostic un caryotype complexe avec monosomie 7 et délétion du bras long du chromosome 5. Une analyse du génome par SNP array à la fois des cellules blastiques et de la peau de cette patiente a permis de voir qu'il existait à l'état hétérozygote une délétion de *TP53* (sur l'ADN constitutionnel). Cette délétion existait en revanche à l'état homozygote dans l'ADN des cellules blastiques liée à un phénomène d'UPD. On retrouve bien une fois encore, un mécanisme propre aux gènes suppresseur de tumeur. Dans ce case report, l'anomalie génétique n'avait pas été rapportée d'autant que dans la famille de cette patiente aucun membre n'a développé un néoplasie. Les auteurs suggèrent qu'il s'agit d'un polymorphisme de susceptibilité aux cancers [Linck DC, 2011].

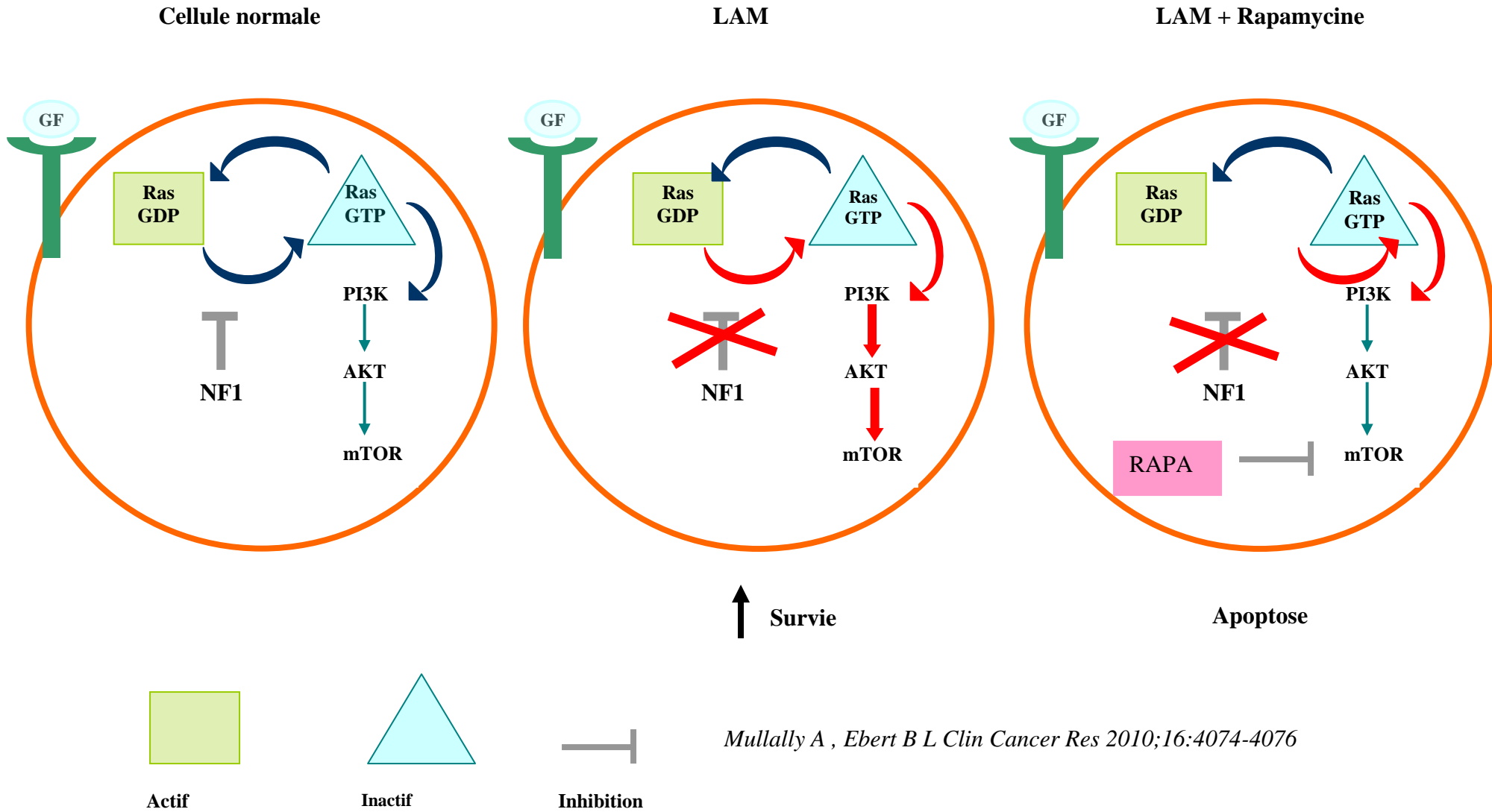
V.10. RMC -17q11.2

Etonnamment, un seul cas (t-14) sur les 82 permet de détecter cette perte alors qu'elle est bien plus fréquente dans la littérature, autour de 8% (tableau 26A). Cette RMC contient un gène candidat suppresseur de tumeur *NF1* (Neurofibromin 1) qui dispose d'une GTPase qui régule négativement la voie RAS en passant de la forme GTP à la forme GDP.

La neurofibromatose est une pathologie neuro-cutanée héréditaire multi systémique prédisposant au développement de tumeurs bénignes et malignes. C'est la maladie de Recklinghausen. *NF1* est également retrouvé impliqué dans la LMMC juvénile (LMMCJ) depuis les années 90 [Shannon KM, 1994] en précisant que *NF1* jouait un rôle de suppresseur de tumeur. L'altération de la voie Ras/MPAK conforte cette implication de *NF1* car les mutations de *N - Ras* sont retrouvées dans les LMMCJ [Kalra R, 1994].

Lorsque *NF1* est inactivé, il en résulte une augmentation du niveau d'expression de Ras et de sa voie de signalisation jusqu'à l'activation de mTOR (mammalian Target of Rapamycin) permettant une augmentation de la survie de la cellule (voir figure 9). En utilisant des cellules blastiques CD34+/CD38- n'exprimant pas *NF1*, Parkin montre que ces cellules sont sensibles à la rapamycine et ainsi ce médicament aurait bien sûr comme cible mTOR. Toutefois, il peut y avoir une absence d'expression de *NF1* sans qu'il ne manque une copie de ce gène. Ceci laisse supposer que des mutations seraient plus impliquées dans les LAM qu'en terme de CNA [Parkin B, 2010]. Mais le statut nullosomique de *NF1* est présent dans 7% des LAM étudiées par cette équipe. Silva en 2009, a retrouvé, parmi 52 patients étudiés présentant une LAM 0 au diagnostic, des LOH particulièrement pour *NF1* (9 % des cas) [Silva FP, 2009].

Figure 9 – Voie de signalisation de Ras (version partielle) où figure la perte de NF1, consécutive de l’activation de Ras, augmentant la survie des cellules blastiques myéloïdes



V.11. Les RMC en 21q22

V.11.1 RMC -21q22.12 : RUNXI

Cette petite RMC de 50Kb est trouvée dans les 2 p-LAM et de 40 Kb dans les 4 t-LAM de cette série. Elle contient le gène *RUNXI*.

Cette fois, la méthodologie pour constituer une RMC est tout à fait satisfaisante, adéquate et solide, puisqu' on parvient à détecter une anomalie récurrente de quelques dizaines de kilobases. Comme on le verra plus loin, elle est également retrouvée dans la littérature.

Le gène *RUNXI*, la sous unité α du Core Binding Factor (CBF), est un facteur transcriptionnel hétérodimérique. Il joue un rôle clef dans la régulation de l'hématopoïèse, de la prolifération et la différenciation des cellules souches.

RUNXI a été identifié dans les leucémies, au niveau du point de cassure de la translocation (8;21) [Miyoshi H, 1991]. Cette translocation est plus fréquente dans les LAM 2 de la classification FAB et représente 18 à 20 % des anomalies chromosomiques dans toutes les LAM [Licht JD, 2001]. C'est l'une des cibles la plus fréquente des translocations chromosomiques [Nguyen TT, 2006] via près de 40 partenaires différents [Huret JL Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol]

Récemment, une fonction « gate keeper » (garde-barrière ou cerbère) a été suggérée pour *RUNXI* dans les leucémies aiguës [Niebuhr B, 2008]. Cette désignation fait suite aux observations de mutations qui paraissent suffisantes pour provoquer une leucémie aigue dans des translocations impliquant ce gène.

On décrit essentiellement 2 types de mutations touchant *RUNXI* : des mutations localisées en N-terminal (Nter) et celles localisées en C-terminal (C-ter) (voir figure 10). Les patients avec une mutation en Nter ont des moelles hypoplasiques avec d'autres anomalies génétiques associées alors que ceux présentant une mutation en Cter ont une moelle hypoplasique mais l'anomalie de *RUNXI* est unique (voir figure 11).

Dans des modèles murins, une mutation Nter est responsable du blocage de la différenciation cellulaire alors qu'une mutation en Cter apporte une capacité à proliférer [voir schémas et figures de Harada Y, 2009].

Des mutations de *RUNXI* germinales hétérozygotes, incluant des délétions [Katzaki E, 2010], sont impliquées dans la FPD (Familial Platelet Disease – Maladie Plaquettaire Familiale) [Song WJ, 1999 ; Osato M, 2004]. C'est une pathologie autosomique dominante présentant une thrombopénie et une thrombopathie. Les malades ont une propension à développer une myélodysplasie et/ou une LAM avec une incidence élevée de 20 à 50% dans cette population. Les mutations sont alors le plus souvent bialléliques [Preudhomme C, 2009]. C'est donc un second événement qui, transformant un clone, fait entrer la maladie dans une LAM, rendant compte aussi de la différence du temps de latence parmi ces patients.

Il a été démontré que les mutations de *RUNXI* ont un rôle dans différentes néoplasies myéloïdes (figure 12). Elles surviennent avec une fréquence faible dans les LAM *de novo* sans phase myélodysplasique [Osato M, 2004]. Les mutations de *RUNXI* sont, en revanche, détectées dans 15 à 35 % des cas des LAM0 [Osato M, 2004]. De plus, ce même auteur rapporte que la moitié des LAM0 avec mutation de *RUNXI* perdent leur allèle sauvage expliquant ainsi la perte de fonction de *RUNXI*. Une équipe allemande a recherché des LOH/UPD au sein de LAM 0. Parmi les 17 autres cas de p-LAM présentant une perte de *RUNXI*, 12 étaient des UPD [Silva FP, 2009]. Il est également rapporté que des LAM *de novo* avec une mutation de *RUNXI* sont associées à une trisomie 21 acquise [Preudhomme C, 2000]. Les 2 cas de p-LAM0 avec délétion

de *RUNX1*, rapportés ici, présentent un caryotype normal en cytogénétique conventionnelle. Récemment, il a été montré que la fréquence de mutation de *RUNX1* est retrouvée dans plus de 30% des LAM avec un caryotype normal ou non complexe [Schnittger S, 2011]. On relève aussi que cette mutation s'associe plus fréquemment avec la mutation en Partial Tandem Duplication PTD de *MLL*.

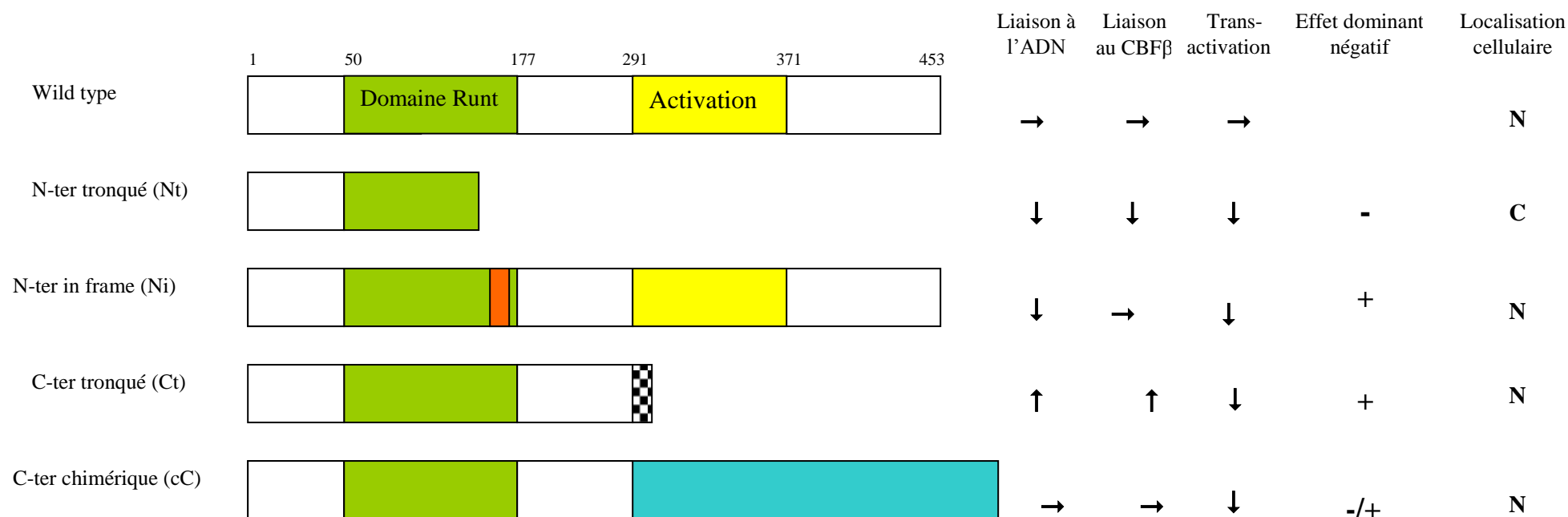
Dans les cas de t-LAM de la première série, deux patients ont perdu leurs deux allèles soit par une double perte soit par une mutation située en Nter, D171N (résultats produits par l'équipe du Professeur Claude Preudhomme du laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille) associée à une délétion sur le second allèle. Cette mutation a été montrée comme étant responsable de la prolifération de cellules myéloïdes immatures et dans la capacité d'accroître l'autorenouvellement ainsi que la prolifération des progéniteurs primitifs [Ding Y, 2009]. Cette localisation en N-terminal est aussi régulièrement retrouvée dans les t-LAM [Christiansen DH, 2004].

Le patient t-29 a un caryotype normal mais il présente une délétion de 310 Kb supprimant la plus grande partie de *RUNX1*, ce qui est retrouvé dans les t-LAM radio induites [Akagi T, 2009, Ding Y, 2009 ; Harada H, 2003]. Un cas t-LAM faisait partie des 52 cas étudiés par Silva [Silva FP, 2009]. Il présentait un caryotype complexe. L'étude en SNP array a révélé la perte de *RUNX1* en UPD.

Trois des 4 cas présentant la délétion de *RUNX1* ont été exposés à une polychimiothérapie contenant les AA alors que deux cas ont été exposés aux anthracyclines. Ils présentent aussi une anomalie du chromosome 7 (-7 ou 7q-) ce qui est une association décrite dans ce type de LAM [Christiansen DH, 2004]. Il a été suggéré qu'une mutation de *RUNX1* et la perte de gène en 7q coopéreraient dans la leucémogénèse et prédisposeraient à une transformation leucémique chez les patients antérieurement traités par AA [Christiansen DH, 2004].

Un travail récent portant sur 57 cas d'anémie de Fanconi, due essentiellement à une mutation de *FANCA*, a montré la perte et/ou l'inactivation de *RUNX1* dans 6 cas [Quentin, 2011] par des anomalies cryptiques. Ils présentaient tous une LAM ou un SMD sévère et l'anomalie de *RUNX1* était observée dans 20% de ces cas. Ce contexte particulier de fragilité chromosomique est à rapprocher de la situation des malades atteints de t-LAM, qui ont eux aussi un taux de dommages important sur leur chromosome. La fréquence similaire des anomalies de *RUNX1* dans les deux situations, plus élevée que dans les p-LAM, est à souligner. Ces résultats montrent le rôle majeur de ce gène dans la leucémogénèse.

Figure 10 - Les différents types de mutations de *RUNX1*.



Les mutations détectées chez les patients sont distribuées sur toute la longueur de la protéine *RUNX1* et peuvent être réparties en 4 types selon les structures des domaines fonctionnels :

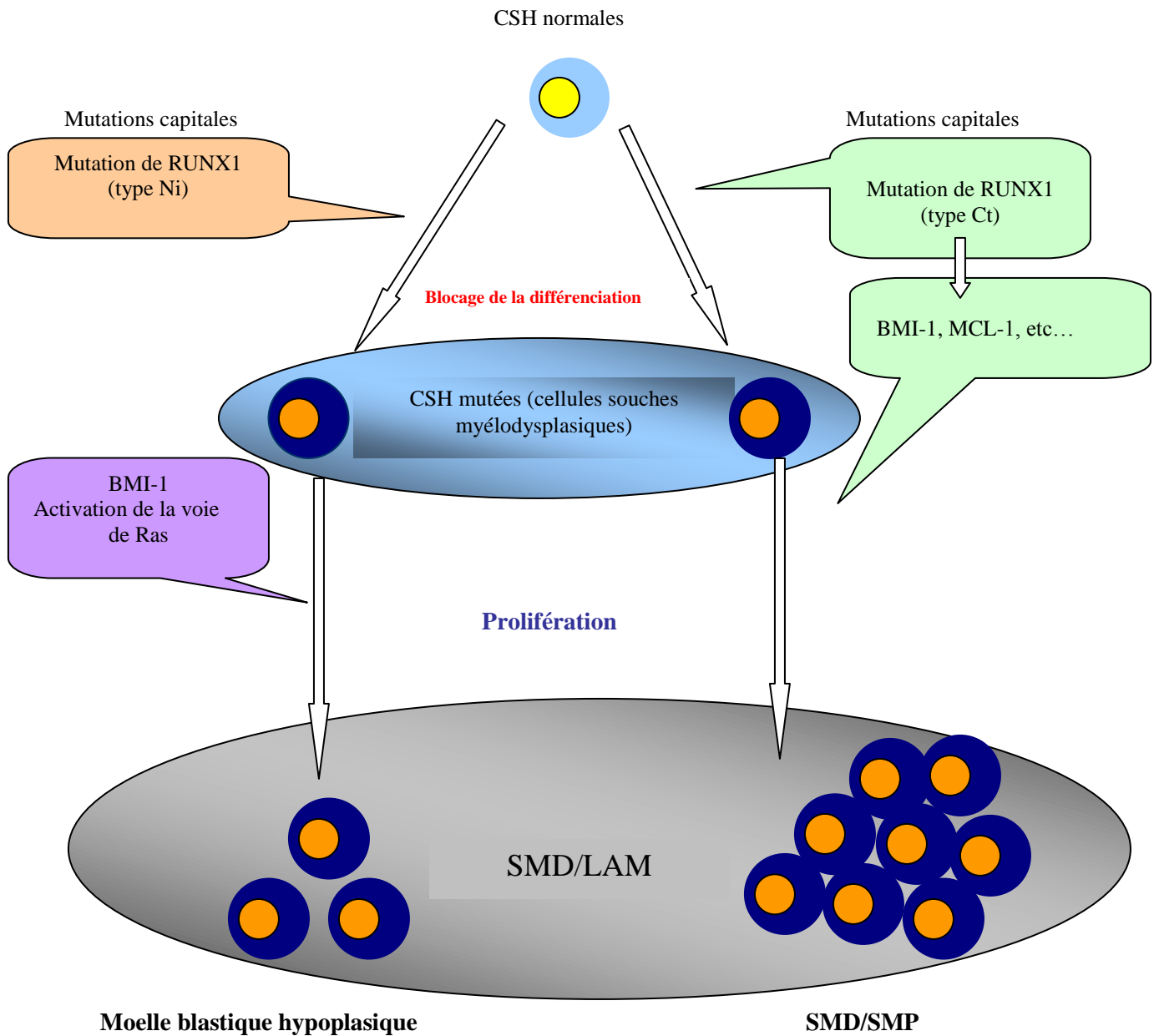
- 1 Nt = mutations tronquées dans la région N-terminale
- 2 Ni = mutation du cadre de lecture dans la partie N-terminale du domaine runt
- 3 Ct = mutations tronquées courtes en région C-terminale
- 4 Cc = mutations de type chimère du cadre de lecture en région C-terminale avec des protéines plus grandes que la protéine wild-type (sauvage).

On peut supposer que ces différents types de mutations ont des fonctions qui diffèrent entre elles.

C= Cytoplasme ; N= Noyau

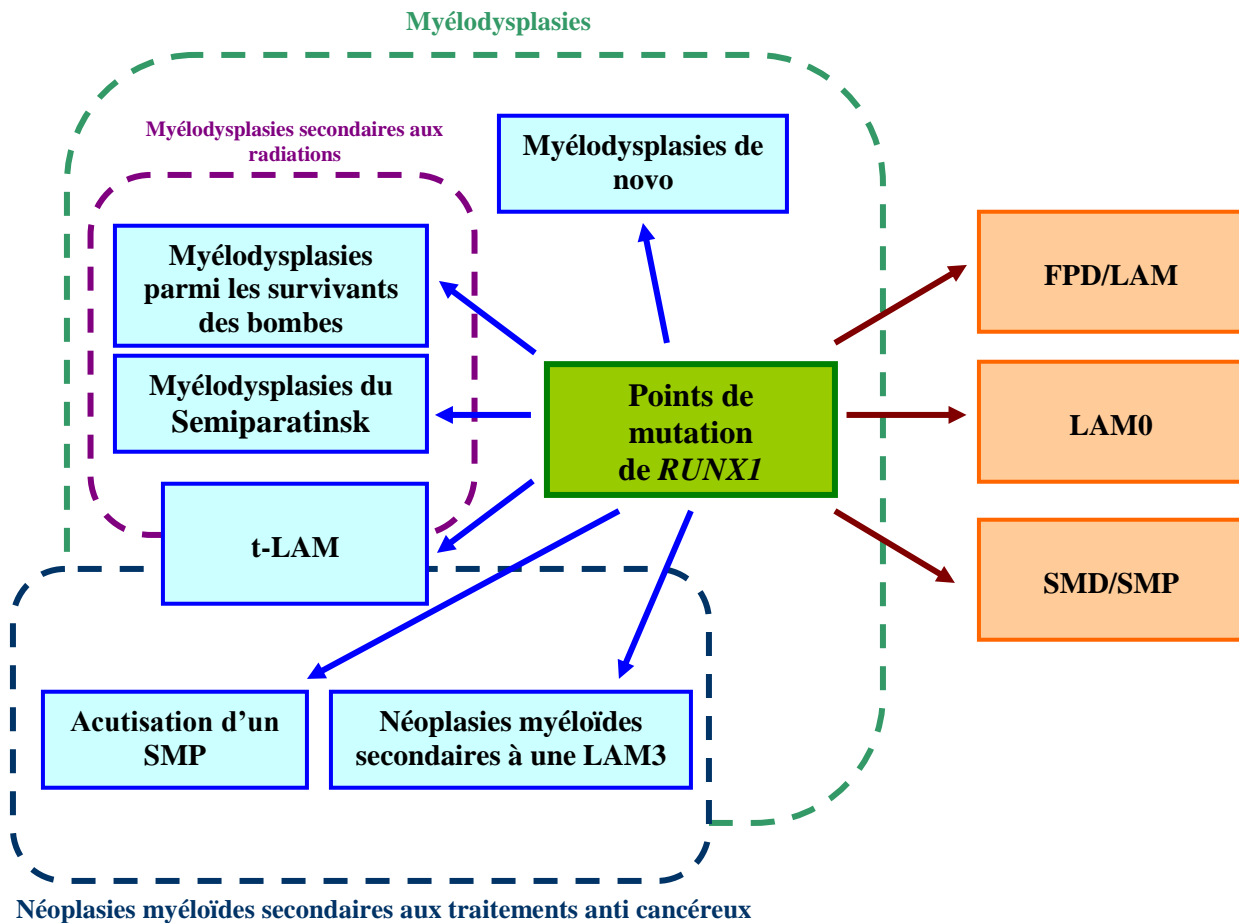
Harada Y and Harada H. J Cell Biochem, 2011, 112(2), 425-438.

Figure 11 – Deux voies moléculaires des SMD/LAM selon 2 types de mutants de *RUNX1*.



Les mutations impliquées dans la première étape de transformation sont spécifiques de gènes capitaux des cellules souches hématopoïétiques (CSH), ou selon les points de mutation du gène *RUNX1*. Ces mutations bloquent la différenciation des CSH normales et les transforment en CSH mutées. Des mutations capitales comme les Cter de *RUNX1* (type Ct) peuvent aussi réduire la capacité de proliférer causant le développement de syndromes myélodysplasiques-myeloprolifératifs type SMD/SMP. Toutefois des mutations Nter (type Ni) nécessitent l'acquisition de gènes partenaires altérés afin d'obtenir la capacité de développer des cellules souches myélodysplasiques qui rendront à terme une moelle blastique hypoplasique.

Figure 12 - Les mutations de *RUNX1* et leur présence dans différentes néoplasies myéloïdes



Semiparatinsk= Aire de tests nucléaires située dans le Kazakhstan

SMP = Syndrome myéloprolifératif

SMD = Syndrome myélodysplasique

FPD = Familial Platelet Disease ; Maladie Plaquettaire Familiale

Harada Y and Harada H. *J Cell Biochem*, 2011, 112(2), 425-438

V.11.2. RMC +21q22 : *ERG* et *ETS2*

On trouve dans la série de patients p-LAM une polysomie distale en 21q11.2qter dans 3 cas (tableau 16) répartis en 2 amplicons dans des caryotypes complexes. Ce type d'amplification a été décrit dans ces types de caryotypes [Mrozek K, 2008].

Le premier amplicon (tableau 13 en annexe) allant de 14,29 Mb à 17, 91 Mb sur le chromosome 21 contient plusieurs gènes et 3 miRNA (miR-99a, miR-125b-2 et hsa-1-let7c). Les gènes de cet amplicon ont été décrits surexprimés dans les cellules CD34+ [Pedersen-Bjergaard J, 2007]. On retient 4 gènes, *SAMSN1* qui est un adaptateur hématopoïétique contenant les domaines SH3 et SAM domain1, *HSP13*, *BTG3* et *NRIP1*. Cette région a été rapportée amplifiée par BAC-CGH array dans une série de patients avec une LAM à caryotype complexe [Balduş CD, 2008]. On y voit que *NRIP1* et *SAMSN1* sont up-régulés contrairement aux LAM de patients à caryotypes normaux.

Le second amplicon de 1 Mb est observé chez les patients p-21 et p-24. Cet amplicon paraît plus fréquent dans les p-LAM (tableau 26B) dont la plupart montre conjointement un gain de *ETS1*. L'amplification de cette région est aussi observée dans les LAM à caryotype complexe [Santoro A, 1996, Balduş CD, 2008] ; elle a été observée amplifiée dans une LAM secondaire à une maladie de Fanconi à caryotype normal [Quentin S, 2011]. Cette région contient 2 gènes candidats : *ERG* et *ETS2*. Ce sont deux membres de la famille Ets dont on a déjà parlé.

ERG (Ets Related Gene) est également un facteur transcriptionnel. En 2008, il a été montré que ce gène est essentiel pour la mégacaryocytopoïèse [Loughran SJ, 2008] et qu'en réalisant des greffes de moelle osseuse à des souris mutées, il confère aux cellules hématopoïétiques leur capacité de différenciation.

Une équipe japonaise [Tzusuki S, 2011] a pu montrer que le maintien des cellules souches hématopoïétiques est lié à *ERG* en utilisant un modèle murin où l'expression de *ERG* a été forcée dans ces cellules.

On a vu précédemment que, comme *FLII* qui lui est très similaire, *ERG* est aussi impliqué dans les sarcomes via des translocations l'amenant à être fusionné avec *EWS*. Cette fusion a été intégrée dans des cellules T de souris qui se sont transformées en blastes [Codrington R, 2005]. On peut supposer que cette fusion fonctionne comme la fusion *TMPRSS2-ERG* dans les cancers de la prostate où *TMPRSS2* vient contrôler l'expression de *ERG* par son promoteur.

Il faut enfin noter que *ERG* avait été retenu il y a une quinzaine d'années, comme un proto-oncogène. Par transfection dans des cellules de la lignée NIH3T3, *ERG* a été hyperexprimé et ces cellules ont montré des capacités à se développer, même en milieu de culture pauvre. L'injection de ces mêmes clones cellulaires dans des souris nude a provoqué une prolifération maligne. Ainsi, *ERG*, serait non seulement un proto-oncogène mais son pouvoir oncogénique existerait lorsqu'il est hyperexprimé [Hart AH, 1995]. Il a même été récemment démontré qu'il est un oncogène de la lignée mégacaryocytaire [Stankiewicz MJ, 2009] tout comme *ETS2*.

ETS2 est exprimé de façon ubiquitaire dans les différents tissus. Dans les cellules hématopoïétiques, il est très exprimé et également dans les monocytes-macrophages mais pas dans les granulocytes [Boulukos KE, 1990]. Ce gène est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes de la mégacaryocytopoïèse [Lemarchandel V, 1993] dans la différenciation des macrophages [Aperlo C, 1996] et dans le développement des cellules T [Zaldmubide A, 2002]. On sait aussi qu'il permet le maintien des cellules dans leur état malin [Sementchenko VI, 1998].

Il faut noter cependant que bien que *ERG* et *ETS2* soient amplifiés dans les p-LAM à caryotype complexe, la sur expression d'*ETS2* a été montrée corrélée à cette amplification génique, ce qui n'est pas toujours le cas pour *ERG* [Balducci CD, 2008 ; Santoro A, 1992] laissant suggérer que des membres d'une même famille ne répondent pas toujours de la même façon dans une voie de signalisation.

L'ensemble des différentes RMC de ce travail et la large utilisation de la littérature servant également de comparaison, ont permis ainsi à cette discussion de marquer plusieurs éléments génomiques aussi bien dans les t-LAM que dans les p-LAM, qui en certains points du génome semblent différentes.

Tableau 26 A - Pertes reportées dans la littérature toutes techniques d'arrays confondues et du présent travail selon l'hg18

Anomalies chromosomiques	N=P+T	P (%)	T (%)	RMC consensuelle Localisation en Mb	Références	Gènes
1p36.2	6	6 (0.9)		7.81-7.89	A, D, E	PER3, UTS2
1p35.1	6	6 (0.9)		22.39-22.44	A, D, E	
1p34.2	3	3 (0.5)		42.07-42.45	A, D, E	KRC, HIVEP3
1p31.3p31.1	3	2 (0.3)	1 (1.7)	67.07-69.95	A, D, E	WDR78,MIERS1,C1orf141,IL12RB2,SERBP1, GADD45A ,GNG12, DIRAS3 , GPR177,RPE65,DEPDC1
1q42.1	3	3 (0.5)		222.6-222.9	D	CNIH4, WDR26 ,CR625980,CNIH3
1q44	2		2 (3.5)	241.94-247.19	K	WDR64, EXO1 ,MAP1LC3C,PLD5?CEP170, AKT3 ,ZNF238, C1orf101,FAM36A,EFCAB2,KIF26B,SMYD3,TFB2M, ADSS, HNRNPU,PPPDE1,AHCTF1
2p23.3	5	5 (0.8)		25.25-25.46	D, E,L	DNMT3A
2p23.1	3	3 (0.5)		30.29-30.95	A, D, E	
2q36.2	8	8 (1.3)		222.01-225.42	A, D, E	EPHA4, PAX3 , FARSB, MOGAT1, ACSL3, KCNE4, AP1S3, WDFY1,SERPINE2,MRPL44,FAM124B,CUL3,SCG2
3p26.3-p25.3	4	3 (0.5)	1 (1.7)	0-9.14	D, G	
3p26.3p12.3	4	1 (0.1)	3 (5.3)	0.8-80.80	A,D	
3p26.3	4	3 (0.5)	1 (1.7)	14.96-16.15	A, D	
3p23q12.1	9	2 (0.3)	7 (12.5)	44.46-49.64	A, D, K	Grand nombre de ZNF; Contient plus de 30 gènes
3q11.2q13.3	5	5 (0.8)		95.03-120.21	D, E	Contient plus de 30 gènes
3q13.1q13.3	2	1 (0.1)	1 (1.7)	106.75-109.60	D	
3q13.3	3	2 (0.3)	1 (1.7)	117.78-118.40	D	
3q24q29	3	2 (0.3)	1 (1.7)	160.62-162.14	D	
3q24q29	3	2 (0.3)	1 (1.7)	164.51-165.39	D	SI,SLITRK3, CR612557
4q13,1q13,3	2	2 (0.3)		62.91-74.29	L	EPHA5,CENPC1,STAP1,GNRHR,SYT14L,DCK, COX 18,mir-1269
4q24	8	8 (1.3)		106.1-106.72	A, D,L	TET2 ,PPA2,FLJ20184,INTS12,GSTCD
4q27q28	6	5 (0.8)	1 (1.7)	122.92-124.45	D	ADAD1,IL21,BBS12,FGF2,NUDT6, SPATA5,SPRY1
4q31.2	4		4 (7.1)	146.62-146.67	D, K	C4orf51

Tableau 26 A - Suite

Anomalies chromosomiques	N=P+T	P (%)	T (%)	RMC consensuelle Localisation en Mb	Références	Gènes
5q11.1	3	2 (0.3)	1 (1.7)	50.16-50.21	D	
5q11.2	3	3 (0.5)		51.79-53.66	D	
5q11.2	5	4 (0.6)	1 (1.7)	55.73-56.92	A, D	
5q11.2	4	3 (0.5)	1 (1.7)	57.49-57.79	A, D	
5q12.1	7	5 (0.8)	2 (3.5)	59.54-59.87	A, D, E	
5q13,1q13,3	2	2 (0.3)		68,20-68,90	L	CCNB1,CENPH,TAF9,RAD17
5q13	14	10 (1.6)	4 (7.1)	82,72-84,65	A, D, E, J	VCAN,HAPLN1,EDIL3
5q14.3q15	22	19 (3.1)	3 (5.3)	86,54-95,19	A, D, E, J, K, L	RASA1,CCNH, TMEM161B,MEF2C, ,CETN3,POLR3G,LYSMD3,GPR98,VLGR1,ARRDC3,NR2F1, FAM172A,POU5F2,ANKRD32,MCTP1,TTC37,UNQ630,ARSK, GPR150,RFESD,RHOBTB3,GLRX
5q15q22.3	20	16 (2.6)	4 (7.1)	95,51-114,14	A, D, E, J	PCSK1,CAST,ERAP1,ERAP2,LNPEP,LIX1,RIOK2,CHD1,PAM, HISPPD1,NUDT12,CR610784,RAB9P1,EFNA5,FBXL17,FER,PJA2MA N2A1, TMEM232,TSLP,WDR36,CAMK4,STARD4,C5orf13, EPB41L4A, APC, SRP19, ZRSR2, REEP5, DCP2, MCC, YTHDC2, KCNN2
5q22.3q31.1	22	19 (3.1)	3 (5.3)	129,23-131,96	A, D, E, J, L	CHSY3,LYRM7,CDC42SE2,RAPGEF6,FNIP1,ACSL6,CSF2,IL3, P4HA2,PDLIM4,IRF1,RAD50
5q31.1	33	24 (3.9)	9 (15.2)	133,52-134,26	A, D, E, H, L	PPP2CA,CDKL3,UBE2B,PHF15,SAR1B,CAMLG,DDX46,C5orf24,TX NDC15,PCBD2
5q31.3q33.1	25	17 (2.8)	8 (14.3)	142,91-148,19	A, D, E, J, K, L	HMHB1,YIPF5,PRELID2,GRXCR2,RBM27,POU4F3, LARS,GPR151,PPP2R2B,TCERG1,STK32A,JAKMIP2,SPINK1, SPINK5,SPINK6,SPINK7,SPINK9,FBXO38,HTR4,SH3TC2
5q33.3	20	16 (2.6)	4 (7.1)	156,39-156,51	A, D, E, J, L	
5q33.3	13	10 (1.6)	3 (5.3)	157,25-158,80	A, D, E, J	CLINT1,EBF1,RNF145,UBLCP1,IL12B

Tableau 26 A - Suite

Anomalies chromosomiques	N=P+T	P (%)	T (%)	RMC consensuelle Localisation en Mb	Références	Gènes
6p25.1p24.3	10	7 (1.1)	3 (5.3)	5,54-8,38	A, B, C, D	FARS2,NRN1,F13A1, LY86 ,MMD1, Zep1 , RREB1 ,SSR1, CAGE1 , RIOK1,DSP,BMP6,TXNDC5,MUTED, EEF1E1
6p22.3p22.2	6	5 (0.8)	1 (1.7)	20,29-23,74	A, B, D, L	
6p22.2p22.1	6	5 (0.8)	1 (1.7)	24,15-26,16	A, B, D	DCDC2,KAAG1,MRS2,GPLD1,ALDH5A1, TTRAP , ACOT13 , GMNMF AM65B ,DKFZp686H12134, HIST1H cluster ,TRIM38,HFE
6q24.1	2	1 (0.1)	1 (1.7)	140,6-142,5	D, F	
6q25.3	2	1 (0.1)	1 (1.7)	156,39-156,61	D	
7p22.2	16	6 (0.9)	10 (17.8)	3,02-3,12	D, K	CARD11
7p14.1	14	9 (1.4)	5 (8.9)	39,5-41,7	D, F, L	
7p12.2	11	7 (1.1)	4 (7.1)	50,18-50,45	D	
7q21.1	5	4 (0.6)	1 (1.7)	85,41-86,44	A, C, E	
7q21.1	14	5 (0.8)	9 (15.2)	90,21-90,44	A, D	PFTK1
7q21.3q22.1	24	12 (1.9)	12 (21.4)	97,69-100,36	A, D, E, K	mir-25, mir-93, mir-106b, LMTK2,BHLHA15,TECPR1,BRI3,NPTX2,TMEM130, TTRAP , SMURF1,KPNA7,MYH16,ARPC1A,PDAP1,BUD31,PTCD1,CPSF4ATP 5J2,ZKSCAN5,CYP3A4,TRIM4,COPS6, MCM7 ,TAF6,GATS,PILRB,PI LRA,ZCWPW1,MEPCE,FBXO24,GNB2, EPO
7q22.1q31.3	3	3 (0.5)		104,25-125,20	L	Contient plus de 30 gènes dont MLL5
7q31.3	26	20 (3.2)	6 (10.7)	121,7-123,9	B, D, F, J, K,Kbis	PTPRZ1 ,LKR/SDH,AASS,FEZF1,CADPS2,RNF133,TAS2R16, NDUFA5,ASB15,WASL,HYAL4
7q33	33	22 (3.6)	11 (19.6)	135,74-137,48	B, D, E, J, K, L	CALD1,TMEM140,STRA8,WDR91,CNOT4,NUP205,FAM180A, MTPN
7q34	31	26 (4.2)	5 (8.9)	139,72-140,02	B, D, E, J, K, L	TBXAS1,PARP12,MST109,JHDM1D,KIAA1718
7q35q36.1	27	23 (3.7)	4 (7.1)	146,12-148,2	B, D, E, J, K, L	CNTNAP2
7q36.1q36.2	50	45 (7.1)	5 (8.9)	152,02-152,80	A, B, D, E, J, K, M	MLL3 , XRCC2 ,ACTR3B,FABP5L3

Tableau 26 A - Suite

Anomalies chromosomiques	N=P+T	P (%)	T (%)	RMC consensuelle Localisation en Mb	Références	Gènes
8p23.2	6	5 (0.8)	1 (1.7)	3,48-3,58	A, D, L	
8p22p21.3	2	1 (0.1)	1 (1.7)	18,72-21,93	D	
8p21.2p12	2	1 (0.1)	1 (1.7)	24,40-36,30	D	
8q22.1	3	3 (0.5)		93,15-94,17	A, K	C8orf83,
8q24.1	4	3 (0.5)	1 (1.7)	117,81-118,38	I	
8q24.1q24.2	4	3 (0.5)	1 (1.7)	126,54-129,58	A, D	
8q24.2	3	3 (0.5)		130,53-130,80	A, D	
8q24.2q24.3	3	2 (0.3)	1 (1.7)	131,51-146,26	A, D	
9p24.3p13.3	7	7 (1.1)		0.19-33.18	A, D, E, L	
9q21.3	5	4 (0.6)	1 (1.7)	82,37-84,44	B, C, D, E	
9q22.3q31.1	5	5 (0.8)		93,92-103,96	C, D, E, K	Contient plus de 30 gènes
9q32q33.1	2	2 (0.3)		116,51-117,92	B, D	
10q23.1q23.3	4	4 (0.6)		87,93-90,77	C, D	
10q24.1q24.2	4	4 (0.6)		96,48-100,81	C, D	
11p15.5p15.4	8	7 (1.1)	1 (1.7)	2,48-3,35	B, C, D, E	KCNQ1,KCNQ1OT1,KCNQ1DN,CDKN1C,SLC22A18,NAP1L4,PHLDA2,CARS,OSBPL5,C11orf36,MRGPRE
11q12.3q13.1	3	3 (0.5)		63.98-65.65	D	
11q13.1q25	4	4 (0.6)		67,25-134,24	B, D, E	
11q23.3	4	2 (0.3)	2 (3.5)	117.86-119.81	A, D, E	

Tableau 26 A – Suite

Anomalies chromosomiques	N=P+T	P (%)	T (%)	RMC consensuelle Localisation en Mb	Références	Gènes
12p13.3	4	2 (0.3)	2 (3.5)	0.06-4.05	D, E	
12p13.2	10	6 (0.9)	4 (7.1)	10,62-11.72	C, D, E, J	
12p13.2	12	10 (1.6)	2 (3.5)	11,2-12,70	C, D, E, F, J	
12p13.2p13.1	21	17 (2.8)	4 (7.1)	12,20-13,13	C, D, E, J, K, Kbis, L	ETV6 ,BCL2L14,LRP6,MANSC1,LOH12CR1,AX748225,DUSP16, CREBL2 ,GPR19,CDKN1B,APOLD1,DDX47,GPRC5A,TVAS4,HEBP1
12p12.3	7	5 (0.8)	2 (3.5)	15,54-19,17	C, D, E, J, K	PTPRO,EPS8,STRAP,MGST1,LMO3,RERGL,PIK3C2G,CAPZA3
12q12	4	3 (0.5)	1 (1.7)	42,64-43,26	A, D, L	
12q13.1	2	2 (0.3)		46,06-46,30	A, D	
12q24.3	5	4 (0.6)	1 (1.7)	81,57-105,06	A, D, E, L	
12q24.3	3	2 (0.3)	1 (1.7)	121,28-122,73	A, D	
12q24.3	3	3 (0.5)		128,71-128,91	A, D, E	
13q14.3	8	7 (1.1)	1 (1.7)	49.63-50.51	C, D, E	
13q21.1	5	5 (0.8)		54,33-54,45	B, D, L	
16p11.1q12.1	20	20 (3.2)		35,06-50,12	D, G	VPS35,SHCBP1,ORC6L,MYLK3,GPT2,DNAJA2,NETO2,ITFG1, PHKB,ABCC12,ABCC11,LONP2,SIAH1,LONP,N4BP1,CBLN1, HEATR3
16q21	24	23 (3.7)	1 (1.7)	57,56-58,96	B, D, G	GPR114,GPR56,GPR97,CCDC135,KIFC3,CNGB1,TEPP,MMP15,CSNK 2A2,GINS3,NDRG4,SETD6,CNOT1,GOT2
16q21	26	24 (3.9)	2 (3.5)	62,51-63,81	D, G, J	
16q22.3	25	22 (3.6)	3 (5.3)	70,76-71,46	D, G, J	VAC14,HYDIN,FTSJD1,CALB2
16q22.3q23.1	26	26 (4.2)		73,30-73,57	G, H, J	BC042734
16q24.1	24	23 (3.7)	1 (1.7)	83,37-85,07	D, G, J	CDH13,HSBP1,MLYCD,OSGIN1,NECAB2,MBTPS1,HSDL1, LRRC50,TAF1C,ADAD2,KCNG4,USP10
16q24.3	26	26 (4.2)		87,30-87,37	G, J, K	FBXO31

Tableau 26 A – Suite

Anomalies chromosomiques	N=P+T	P (%)	T (%)	RMC consensuelle Localisation en Mb	Références	Gènes
17p13.2p13.1	24	18 (2.9)	6 (10.7)	4,01-8,20	A, D, J	Contient plus de 30 gènes dont TP53, NLRP1, NUP88, C1QBP, XAF1
17p12p11.2	9	7 (1.1)	2 (3.5)	14,74-19,35	A, D, E	
17p11.2	6	5 (0.8)	1 (1.7)	20,02-21,45	C, D, E	
17q11.2	56	51 (8.0)	5 (8.9)	26.49-27.52	A, D, E, G, H, J, K, M	NF1
17q21.33	6	4 (0.6)	2 (3.5)	44.98-45.43	D, E	
17q21.33	5	5 (0.8)		46.22-47.56	D, E	
17q25.1q25.3	3	3 (0.5)		69.43-73.16	D	
18p11.32p11.31	14	12 (1.9)	2 (3.5)	1-4,62	D, G, J	C18orf2, METTL4, NDC80, SMCHD1, EMILIN2, LPIN2, MYOM1, MYL12B, TGIF1, DLGAP1
18p11.23	17	16 (2.6)	1 (1.7)	7,42-7,58	G, H, J	PTPRM
18p11.22p11.21	5	4 (0.6)	1 (1.7)	9,03-13,81	D, H	
18q11.2	9	8 (1.3)	1 (1.7)	18,1-22,05	D, G	
18q11.2q12.2	21	18 (2.9)	3 (5.3)	21,74-33,13	D, G, K	CABYR, OSBPL1A, IMPACT, HRH4, ZNF521, SS18, PSMA8, TAF4B, CDH2, DSC3, DSC1, DSC2, DSG4, DSG3, DSG2, TTR, RNF125, DTNA, MAPRE2,
18q21.1	22	21 (3.4)	1 (1.7)	43,39-46,37	D, E, G, K	HAUS1, LOXHD1, PIAS2, SMAD2
18q21.2	22	20 (3.2)	2 (3.5)	50,21-51,05	D, E, G, K	DCC
18q21.32	22	20 (3.2)	2 (3.5)	55,08-55,51	D, E, G, J, K	ONECUT2, FECH, NARS, ATP8B1
18q22.3	23	22 (3.6)	1 (1.7)	69,06-69,18	D, E, G, K	
18q22.3q23	4	2 (0.3)	2 (1.7)	71,06-71,76	E, G, J	FBXO15
19p13.3	3	2 (0.3)	1 (1.7)	0,21-1,81	A, D	
19q13.2q13.43	2	2 (0.3)		46.16-63.43	C, D	
20q11.2	2	2 (0.3)		32,47-33,60	L	ITCH, BLP, PIGU, NCOA6, GGT7, ACSS2, PROCR, EIF6, ERGIC3, miR-644, miR-499, miR-1289-1
20q11.2q13.1	4	4 (0.6)		34.59-43.45	E, L	Contient plus de 30gènes
20q13.1q13.3	2	2 (0.3)		43.85-55.73	E	Contient plus de 30 gènes
21q22.12	12	8 (1,3)	4 (7.1)	35.11-35.15	A, D, E, K, Kbis	RUNX1
21q22.3	3	3 (0.5)		44,70-45,09	D	

Tableau 26 B - Gains reportés dans la littérature toutes techniques d'arrays confondues et du présent travail selon l'hg18

Anomalies chromosomiques	N=P+T	P (%)	T (%)	RMC consensuelles Localisation en Mb	Références	Gènes
1q21.3q22	5	4 (0.6)	1 (1.7)	153.19-154.64	C, D, K, L	S100A8,S100A9,S100A13,S100A6 ,SNAPIN,ILF2,NPR1,INTS3, VLCS-3, GATAD2B, TORC2, CREB3L4, TPM3, HAX1, IL6R, SHE , UBE2Q1, ADAR, CHRNB2
1q32.1	4	3 (0.5)	1 (1.7)	204.98-205.04	C, D, L	
1q32.1q44	7	6 (0.9)	1 (1.7)	235.00-235.10	A, B, K	BC016972 ?
3q26.3q29	3	3 (0.5)		170.12-199.31	E, L	Contient plus de 30 gènes
4p13q12	2	2 (0.3)		42,30-58,23	B, D	
4q12q13.1	2	2 (0.3)		59,13-62,98	B, D	
4q28.3	2	2 (0.3)		132,8-136,7	B, G	
5p13.2q11.1	2	1 (0.1)	1 (1.7)	37,98-50,15	A, D	
5q11.2	3	2 (0.3)	1 (1.7)	51,21-54,12	A, D	
6q11.2q12	8	8 (1.4)		63,43-63,7	A, G	
6q27	3	2 (0.3)	1 (1.7)	168.12-168.32	D, K	MLLT4
7p15.2	4		4 (7.1)	27.15-27.18	K	HOXA7, HOXA9, HOXA10
8q24.3	31	24 (3.9)	7 (12.5)	143.73-143.90	B, D, E, G, I, J, K	JRK,PSCA,LY6K,C8orf55,LYPD2,SLURP1,LYNX1,LY6D
9p21.3	2	2 (0.3)		21.5-23.4	F, G	
9q13q21.3	2	2 (0.3)		70.23-83.52	E	FXN,APBA1,TJP2,SMC5,TRPM3,GDA,TCM1,ANXA1,RARB,RFK, GNA14,TLE4,TLE1
11q12.1q14.1	18	18 (2.9)		59.1-79.6	G	Contient plus de 30 gènes
11q14.1	5	5 (0.8)		79.6-81.3	D, G	
11q14.3q22.3	2	2 (0.3)		89.29-104.86	L	Contient plus de 30 gènes; miR-1261, miR-5481
11q23,3	3	2 (0.3)	1 (1.7)	117,20-118,56	Kbis, L	FXYD2, FXYD6, IL10RA,SCN4B, SCN2B, MPZL3, MPZL2, CD3D, CD3G, MLL , ARCN1, PHLDB1, TREH, DDX6, BCL9L, ABCG4
11q24.2q24.3	34	34 (5.6)		126,53-130,23	D, E, G, J, L	KIRREL3, ETS1,FLI1 ,C11orf45, TP53AIP1 ,RICS,BARX2, NFRKB , PRDM10,APLP2,ST14,ZBTB44
12p13.33p11.21	13	13 (2.1)		0.1-32.7	E, G	Ne contient pas de gène
13q12.11q13.1	3	3 (0.5)		19.9-31.7	G	
13q31.3	2	2 (0.3)		90.45-90.97	E	GPC5

Tableau 26 B – Suite

Anomalies chromosomiques	N=P+T	P (%)	T (%)	RMC consensuelles Localisation en Mb	Références	Gènes
15q21.1	3	3 (0.5)		46,52-47,36	B, D, E	
15q21.3q22.1	3	3 (0.5)		55,6-56,6	B, E, F	
15q23	5	5 (0.8)		67,44-68,37	B, E, J	SMAD3 ,AAGAB, MAP2K5 ,LBXCOR1,PIAS1
15q26.q26.3	6	6 (0.9)		92,5-100,0	C, E, G	
17q12	7	5 (0.8)	2 (3.5)	32,82-33,20	C, D, E, J	TMEM132E
17q21.2q21.31	7	4 (0.6)	2 (3.5)	37,08-38,48	D, E, J	FBXO47,PLXDC1,FBXL20, MED1 ,CRKRS,TCAP,PGAP3, ERBB2 ,GRB7,IKZF3, GSDMB ,ORMDL3,PSMD3, CSF3 ,MED24,THRAP4,NR1D1,MSL1,CASC3,WIPF2, CDC6 , RARA
19p13.3p13.12	13	13 (2.1)		2.19-14.11	D, G, J	
19p13.12p13.11	13	13 (2.1)		16,0-16,15	F, G, J	
19q13.31	2	2 (0.3)		49.2-49.9	D, F	
19q13.41	2	2 (0.3)		58,3-59,1	D, G	
20q11.1q11.21	3	3 (0.5)		28.2-30.5	E, G	
21q21.1	2	2 (0.3)		14.29-17.97	K	POTED,LIPI,RBM11, ABCC13 ,STCH,SAMSN1,USP25
21q22.2	20	20 (3.3)		38.65-38.85	C, D, E, G, J, K	ERG , ETS2
21q22.3q	7	7 (1.1)		45,09-46,91	D, E, K, L	RRP1B,PDXK,RRP1,CSTB,AGPAT3,TRAPPC10,TMEM1,PWP2,C21orf33,ICOSLG,DNMT3L,AIRE,PFKL,TRPM2,LRRC3,UBE2G2,SUMO3, PTTG1IP , PBF ,ITGB2,ADARB1,COL18A1
22q12.3	13	12 (2.1)	1 (1.7)	33,90-35,32	D, G	LARGE
22q13.1q13.2	14	13 (2.1)	1 (1.7)	36,78-42,24	D, G	Contient plus de 30 gènes
22q13.31q13.32	11	10 (1.6)	1 (1.7)	44,92-48,08	D, G	PRR5 ,ARHGAP8,PHF21B,NUP50,UPK3A,SMC1B,ATXN10, WNT7B ,GTSE1,GRAMD4

P= nombre de p-LAM T= nombre de t-LAM % rapport P/506 ou T/56 ; certaines lignes sont vierges par manque d'information sur les gènes présents

A=Akagi T, 2009 ; **B**= Akagi T, 2009 ; **C**=Akagi T, 2009 ; **D**=Parkin B, 2010 ; **E**= Parkin B, , 2010 ; **F** = Paulsson K, 2006 ; **G**= Rucker FG, , 2006 ; **H**=Suella J., 2007 ; **I**= Tyybakinoja A, 2007 ; **J**=Walter MJ, 2009; **K**= Présent travail en aCGH 244K ; **Kbis**= Présent travail en aCGH 2x400K ; **L**=Bajaj R, 2011;**M**=Kühn MWM.

VI. TRANSCRIPTOME ET miRNOME

VI.1. Etude préliminaire du transcriptome

Parmi les gènes les plus sur exprimés, on a trouvé dans le groupe des p-LAM *SERPINB2*, *NPTX1*, *IL8*, *SLC7A11* et *CXCL5*. Dans le groupe des t-LAM, on retrouve les trois mêmes premiers gènes de la liste ci-dessus mais *MYCN* et *NPTX1* sont plus fréquents et même exclusivement retrouvé dans les t-LAM comme *HOXA9*.

- *MYCN*: membre de la famille *MYC*. C'est un proto-oncogène. La protéine présente un domaine de liaison à l'ADN et joue un rôle de facteur de régulation de la transcription lorsqu'elle se présente sous la forme d'un hétérodimère au sein d'un complexe MAX. L'expression de *MYCN* est essentiellement dans le système nerveux, les reins, les poumons et la rate, il s'exprime également au cours du développement. On retrouve une amplification de ce gène dans les neuroblastomes [Bell E, 2010].
MYCN possède plusieurs cibles rappelées dans le tableau publié par ce même auteur [Bell E, 2010]. Parmi ses cibles, on s'aperçoit qu'il active MDM2 qui va down-réguler p53. En revanche il peut être une cible thérapeutique pour l'acide tout trans rétinolique [Bell E, 2010].
MYCN se trouve impliqué dans les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) où il existe une amplification du gène [Fabris S, 2011 ; Deambrogi C, 2010 ; Chapiro E, 2010]. On peut le voir également amplifié dans la transformation de LLC en syndrome de Richter [Scandurra M, 2010].
- *NPTX1* (Neuronal pentraxin I precursor): membre de la famille des pentraxine neuronale. Le gène est similaire au gène *NPI* du rat qui code une protéine de liaison à la toxine venimeuse taipoxine du serpent. Sa localisation est exclusive au système nerveux. Récemment il a été montré qu'il serait régulé via la voie mTor dans les astrocytome sub-épendimaire [Tyburczy ME, 2010] mais aussi dans les cancers colo-rectaux lorsqu'il est hyperméthylé [Mori Y, 2011].
- *SERPINB2* (serine protease inhibitor ou PAI-2): Sa surexpression a été récemment étudiée par l'équipe de Cochran [Cochran BJ, 2011]. L'auteur rappelle que les UPA (Urokinase Plasminogen Activator) et leurs inhibiteurs spécifiques Serpin E1 (PAI-1) et Serpin E2 (PAI-2), sont surexprimés dans les cancers avec un potentiel métastatique accru. Toutefois, les patients avec une surexpression de Serpin2 semblent avoir un meilleur pronostic. La même équipe travaillant sur le cancer du sein arrive à la même conclusion [Croucher DR, 2008]. En 1999, une équipe n'a pas pu montrer que l'expression de *SERPINB2* dans la moelle osseuse et le sang soit significative [Missen MA, 1999]. En revanche son expression est inductible dans les monocytes. Il existe un pic d'expression à J12 dans les progéniteurs CD34+ mis en culture lorsqu'ils rentrent en différenciation myélomonocytaire [Missen MA, 1999]. Le niveau d'expression dans les blastes médullaires a été également recherché lors du diagnostic de LAM. Celui-ci est bas sauf lorsqu'il s'agit d'une LAM2, LAM4 ou LAM5 [Missen MA, 1999]. Lorsque l'on dose PAI-2 on s'aperçoit que les valeurs diminuent après traitement dans les LAM4 et les LAM5, ce taux remonte lors des rechutes [Scherrer A, 1991 ; Wada

H, 1993]

- *IL8* (interleukine 8) : cytokine de la réponse inflammatoire. *IL8* a été impliquée dans les cancers gastriques [Savage SA, 2004]. Mais une méta-analyse de Persson montre que ce gène ne le serait pas [Persson C, 2010].
- *SLC7A11* (Solute carrier family 7) : échangeur cationique spécifique de la cystéine (et du glutamate). Il est aussi appelé *xCT*. Les cellules lymphoïdes ne sont pas capables de synthétiser la cystéine et on retrouverait impliqué cet échangeur dans des lymphomes lorsqu'il est défectueux [Gout PW, 2001].
En revanche, *SLC7A11*, est surexprimé dans des cancers mammaires via la down-régulation de miR26b dont *SLC7A11* en est la cible [Liu XX, 2011].
- *CXCL5* (Chemokin (C-X-C motif) ligand 5 precursor) : sa production est concomitante à celle de l'IL8. Un grand nombre de chémokines sont produites par les myéloblastes et certaines d'entre elles participeraient à la leucémogénèse via la régulation de la migration cellulaire telle que *CXCL12/CXCR4* [Kittang AO, 2010]. Rien n'est encore décrit pour *CXCL5*.
Comme le rappelle Li dans son article, *CXCL5* est impliqué dans l'angiogénèse, la croissance tumorale et les métastases. L'auteur montre aussi que sa surexpression est présente dans les cancers pancréatiques et en est un facteur pronostic péjoratif [Li A, 2011].

Parmi les gènes les plus sous exprimés, on a trouvé dans le groupe des p-LAM, les gènes *DEFA4*, *W60781*, *OLFM4*, *AMP* et *ARG1* ; dans les t-LAM on trouve aussi les gènes *DEFA4* et *W60781* auxquels s'ajoutent *DEFA3* et dans une moindre mesure *OLFM4*.

- *DEFA4* (Defensin α 4 preproprotein) : appartient à la famille des peptides bactéricides et cytotoxiques dans la défense de l'hôte. Son activité corticostatique inhibe la production de la corticostérone stimulée par la corticotropine. Il n'y a pas à ce jour de publication mettant en relation ce gène à l'oncogénèse.
- *W60781* : il n'y a aucune donnée sur ce gène à l'heure actuelle.
- *OLFM4* (olfactomedin 4 precursor) : ce gène a été identifié dans cellules myéloïdes induites par du GCSF. Il fait partie de la famille des olfactomédines dont certains membres joueraient un rôle dans la tumorigénèse et dans la modulation de certaines voies de signalisation. Son expression est régulée par PU1 qui est un membre de la famille des ETS, et par NF κ B. Il a été montré aussi impliqué dans les cancers coliques. Lorsque le niveau d'expression de *OLFM4* est diminué, le pronostic de ces cancers est mauvais. Dans 21% des cas de LAM étudiés, *OLFM4* est pourtant up-régulé (surtout dans les LAM4) [Liu W, 2010].
- *AMP* (adenosin monophosphate) : il est impliqué dans une multitude de voies de signalisation et dans le fonctionnement basal de toutes les cellules.
- *ARG1* (arginase 1) : 21 SMD ont été étudiés incluant 7 cas de SMD 5q- ainsi que 2 LAM : on le retrouve up-régulé dans 9 cas sur 21. Ce travail a permis de rappeler que *ARG1* promeut la prolifération cellulaire et qu'il est également up-régulé dans des cancers du sein [Pellagetti A, 2004].
- *DEFA3* (Defensin α 3 preproprotein) : il présente les mêmes activités que *DEFA4*.

L'échantillonnage de patients t-LAM et p-LAM est très petit ne permettant probablement pas une bonne analyse des résultats. Il faudra augmenter le nombre de cas en proposant systématiquement une étude du transcriptome pour chaque patient étudié en CGH array. Plusieurs échantillons sont actuellement disponibles pour poursuivre ce travail. Ceci permettra également d'augmenter la cohorte de patients t-LAM et p-LAM pour l'étude des anomalies génétiques acquises.

VI. 2. Etude préliminaire du miRNome

L'analyse préliminaire du miRNome montre que le miRNA le plus surexprimé avec un ratio égal à 9,97 est miR-181a. Il a été formulé qu'il serait un facteur pronostique important. L'équipe de Schwind [*Schwind S, 2010*] a étudié 187 p-LAM à caryotype normal chez des patients de moins de 60 ans. Les cas présentant un nombre élevé de blastes circulants et le type LAM1 ou LAM2 ont un niveau d'expression de miR-181a très élevé. De plus, les patients avec une forte expression de miR181a obtiennent une rémission complète et un taux de survie plus prolongé.

Il est actuellement difficile avec si peu de cas de trouver une corrélation entre le génome, le transcriptome et l'expression des miRNA.

L'essentiel est de poursuivre ces travaux et de conduire des études fonctionnelles sur les gènes qui apparaissent « très » candidats dans la leucémogénèse et à long terme de découvrir quels seraient ceux qui permettraient d'aboutir à une thérapeutique ciblée ou préventive des traitements néoplasiques actuels.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Depuis plusieurs décennies, le développement des outils de recherche, bien souvent devenus des outils diagnostiques et pronostiques, ont permis de mieux classer les leucémies aiguës comme le prouvent les modifications successives et régulières de la classification OMS. Les données cytogénétiques (caryotypes et FISH) puis les données de biologie moléculaire en sont les principaux acteurs.

Dans un futur proche, la CGH array Haute Résolution pourrait modifier à son tour cette classification puisqu'elle permet de mettre en évidence des anomalies (CNA) cryptiques.

Ensemble, caryotype, FISH et la CGH array sont complémentaires. On pourrait dénommer cet ensemble la cytogénomique. La CGH array ne dispense pas de la réalisation du caryotype puisque les anomalies équilibrées ne sont pas visibles par cette technique ; la FISH reste indispensable pour confirmer précisément certains résultats.

Des études donnent également un intérêt pronostique à la CGH array, notamment dans les LAM à caryotypes normaux, en montrant une corrélation entre le nombre de CNA trouvés et la survie [Suela J, 2007 ; Parkin B, 2010 ; Thiel A, 2011].

Lorsque ce travail de thèse a débuté, la disponibilité et la mise en place des puces SNP n'étaient pas encore possibles. Cet outil aurait permis probablement l'obtention de résultats portant sur des LOH.

Comme on le sait, ces technologies ne cessent de gagner en performance et des outils de nouvelles générations sont déjà utilisés dans les LAM [Ley TJ, 2008 ; Mardis ER, 2009] où le séquençage va supplanter les arrays. Il existe déjà des super séquenceurs (NGS) qui permettent de détecter des changements acquis de paires de base.

Les auteurs L. Bullinger et S. Fröhling, de Ulm, ont publié en 2012, sous le titre "Array-based cytogenetic approaches in acute myeloid leukemia: clinical impact and biological insights" un article reprenant un bon nombre de données référencées utilisées dans cette thèse et aboutissent à des conclusions similaires et élargissent leur réflexion sur l'utilisation prochaine d'outils très performants tels que le séquençage du génome entier (WGS pour Whole Genome Sequencing) afin de découvrir d'autres éléments génétiques pouvant participer à la leucémogénèse myéloïde [Bullinger L, 2012].

L'utilisation de ce tout nouvel outil dans les LAM va non seulement permettre d'étudier le génome des cellules blastiques dans son entier en déterminant, à la base près, les mutations de petite taille. Il permettra aussi de décrire les variations structurales telles que les translocations (qui ne sont pas détectées par l'aCGH), les délétions, les amplifications et les UPD sur l'ensemble du génome [Welch JS, 2011]. Enfin, cet outil donnera aussi les indications de nombre de copies donné par l'aCGH. Cependant, les prix sont encore élevés et les annotations du génome encore insuffisantes ainsi que les algorithmes bioinformatiques encore en développement.

Ainsi, le travail intéressant mené par l'équipe de Welch [Welch JS, 2011] a montré l'existence d'une fusion cryptique entre *PML* et *RARA* alors que la FISH classique n'avait pas pu mettre en évidence ni la fusion *PML-RARA* ni *X-RARA* au sein de cellules d'une LAM3 cytologiquement typique. En utilisant la WGS, il s'est avéré qu'il existait deux points de cassure entre les chromosomes 15 et 17 au niveau du locus *LOX1/PML* et le locus *RARA*. La PCR a confirmé l'insertion d'un segment de 77 Kb du chromosome 15 contenant une partie de *LOX1* et de *PML* dans l'intron 2 de *RARA*. L'auteur a poursuivi son travail en ayant à sa disposition 11 cas similaires de LAM3 sans *X-RARA* diagnostiqué. De la même façon, il a trouvé deux insertions cryptiques (un cas avec *PML* inséré dans *RARA* et un cas avec *RARA* inséré dans *PML*).

Cependant avec cet outil on s'aperçoit une fois de plus que la plupart des anomalies (SNV, Single Nucleotide Variant) retrouvées dans les études publiées [Walter MJ, 2012, Ding L, 2012, Ley TJ, Mardis ER, 2008] ne sont pas récurrentes. Une distribution aléatoire de ces mutations semble être fréquente dans les LAM. Toutefois, on retrouve bien des gènes impliqués dans la leucémogénèse tels que *RUNX1*, *TP53*, *IDH1* ou *FLT3* pour ne citer qu'eux. D'ailleurs, c'est en réalisant la séquence d'une LAM1 que Mardis *et al* [Mardis, 2009] a mis en évidence l'implication de *IDH1*.

L'utilisation de la WGS va également permettre de comprendre comment d'un état pré leucémique myéلودysplasique la moelle osseuse va s'acutiser. Les travaux de Walter [Walter MJ, 2012] sur les LAM secondaires d'une part et de Ding [Ding L, 2012] d'autre part, montrent qu'il existe une évolution génétique d'un clone primitif ou d'un sous clone qui va acquérir des mutations d'autres gènes. Walter explique que les LAM secondaires apparaissent oligoclonales avec la persistance du clone déjà présent lors de la phase myéلودysplasique tandis que Ding explique, par son travail, que la rechute va présenter des mutations supplémentaires par rapport au clone ou sous clone initial. Ces données sont compatibles avec les modèles pré-existants d'évolution clonale [Lejeune J, 1963, Nowell PC, 1976].

Ce présent travail a porté sur 36 t-LAM et 46 p-LAM en utilisant des CGH array de haute résolution. Les CNA ont été nombreuses, pas toujours communes entre les 2 groupes de leucémies étudiées. Les RMC trouvées sont distinctes dans ces 2 groupes. Enfin le relevé (indiqué dans les tableaux 26A et 26B), soit la première synthèse de données publiées avec la technique de puces (aCGH et/ou SNP) dans les LAM, semble détacher des régions différentes. On a pu ainsi affiner la taille de certaines régions et préciser l'existence de gènes candidats aux mécanismes de la leucémogénèse. Ils sont résumés dans le tableau 27.

Cependant, on a pu s'apercevoir aussi que certaines RMC ne permettent pas de distinguer des gènes candidats tel que *EGR1*, pouvant faire penser que cette méthodologie n'est peut être pas toujours adaptée. Or le fait de retrouver des gènes tels que *RUNX1* ou *TET2* est tout à fait confortant dans ce choix d'outil diagnostique et/ou pronostique.

Ainsi on pourrait utiliser l'aCGH au diagnostic pour proposer au clinicien et au patient la possibilité d'une prise en charge optimisée sur des arguments clinico-biologiques de haute précision.

L'apport de l'aCGH 244K paraît la plus satisfaisante, l'aCGH 400K semblant trop « sensible » car elle apporte trop d'informations avec des CNA de très petite taille et non codantes. La performance des puces Agilent® est intéressante pour son rapport signal/bruit de fond. Les lames Affimetrix® en simple couleur apporte quant à elles des informations sur les LOH.

Enfin, dans ce travail il existe un facteur limitant qui aurait permis d'augmenter la pertinence des résultats : il s'agit du nombre d'échantillons disponibles cryopréservés. L'équipe de MacKinnon a très récemment publié qu'il est possible d'extraire suffisamment d'ADN, de qualité, de moelles osseuses à partir de lames de chromosomes fixées, conservées en laboratoire dit de routine. Ainsi, ces ADN extraits permettent la réalisation d'analyses aussi bien en aCGH qu'en SNP [MacKinnon RN, 2012]. De cette façon il sera plus aisé d'enrichir le nombre de données à partir des multiples lames stockées au laboratoire.

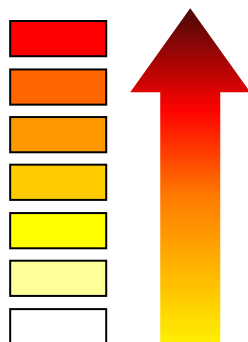
Comme tout examen complémentaire, il sera important pour chaque patient d'envisager ce que

l'on rechercherait en premier pour bien étoffer le plus rapidement possible le diagnostic et le pronostic de la maladie avant de débiter toute thérapeutique, d'autant plus que l'on se trouvera de plus en plus dans une ère de thérapeutiques ciblées.

Tableau 27 - Tableau de synthèse des gènes candidats dans les t-LAM et les p-LAM

REGIONS PERDUES	GENES CANDIDATS	t-LAM	p-LAM
1q	SMYD3		
3p	PROK2 SHQ1		
4q	TET2		
5q	RASA1 PCK1 EGR1 UBE2B		
7q	PFTK1 TRRAP BUD31 ZNF394 MCM7		
7p	CARD11		
12p	ETV6		
17p	TP53		
17q	NF1		
21q	RUNX1		

REGIONS GAGNEES	GENES CANDIDATS	t-LAM	p-LAM
7p	HOXA6 HOXA7 HOXA9 HOXA10		
8q	PSCA C8orf55		
11q	ETS1 FLI1		
21q	ETS2 ERG		



Blanc : fréquence nulle

à

Rouge : fréquence la plus élevée

Autres couleurs : fréquences intermédiaires de la moins élevée vers la plus élevée selon le sens de la flèche.

BIBLIOGRAPHIE

(313 références)

Akagi T, Ogawa S, Dugas M, *et al.* Frequent genomic abnormalities in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome with normal karyotype. *Haematologica*, 2009, 94(2) 213–223.

Akagi T, Shih LY, Ogawa S, *et al.* Single nucleotide polymorphism genomic arrays analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia cells. *Haematologica*, 2009, 94(9), 1301–1306.

Akagi T, Shih LY, Kato M, *et al.* Hidden abnormalities and novel classification of t(15;17) acute promyelocytic leukaemia (APL) based on genomic alterations. *Blood*, 2009, 113(8) 1741–1748.

Allan JM, Smith AG, Weatley K *et al.* Genetic variation in XPD predicts treatment outcome and risk of acute myeloid leukemia following chemotherapy. *Blood*, 2004, 104, 3872-3877.

Altman AJ. Clinical features and biological implications of acute mixed lineage (hybrid) leukemias. *Am J Ped Hematol Oncol*, 1990, 12(2), 123-133.

Andersen MK, Johansson B, Larsen SO, Pedersen-Bjergaard J. Chromosomal abnormalities in secondary MDS and AML. Relationship to drugs and radiation with specific emphasis on the balanced rearrangements. *Haematologica*, 1998, 83(6), 483-488.

Andersen MK, Larson RA, Mauritzson N *et al.* Balanced chromosome abnormalities inv(16) and t(15;17) in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002, 33(4), 395-400.

Aperlo C, Pognonec P, Stanley ER *et al.* Constitutive c-ets2 expression in M1D+ myeloblast leukemic cells induces their differentiation to macrophages. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(12), 6851-6858.

Armesilla-Diaz A, Bragado P, Del Valle I *et al.* p53 regulates the self-renewal and differentiation of neural precursors. *Neuroscience*, 2009, 158(4), 1378-1389.

Au WY, Fung AT, Ma ES *et al.* Low frequency of FLT3 gene internal tandem duplication and activating loop mutation in therapy-related acute myelocyticleukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004, 149(2), 169-172.

Azarova AM, Lyu YL, Lin CP *et al.* Roles of DNA topoisomerase II isoenzymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Processing of the National Academy of Sciences of the USA*, 2007?26(104),11014-11019.

Baldus CD, Bullinger L. Gene expression with prognostic implications in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Semin Oncol*, 2008, 35(4), 356–364.

Bajaj R, Xu R, Xiang B, *et al.* Evidence-based genomic diagnosis characterized chromosomal and cryptic imbalances in 30 elderly patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Mol Cytogenet*, 2011, 20, 4, 3.

Baumann P, Benson FE, West SC. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*, 1996, 87(4), 757-766.

- Bell E**, Chen L, Liu T *et al.* MYCN oncoprotein targets and their therapeutic potential. *Cancer Lett*, 2010, 293(2), 144-157.
- Bejar R**, Levine R, Ebert BL. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 2011, 29(5), 504-515.
- Bennett LB**, Schnabel JL, Kelchen JM *et al.* DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2009, 48(9), 828-841.
- Beranek DT**, Weis CC, Swenson DH. A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis*, 1980, 1(7), 595-606.
- Beranek DT**. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agent. *Mutation Research*, 1990, 231(1), 11-30.
- Berger AH**, Knudson AG and Pandolfi PP. A continuum model for tumor suppression. *Nature* 2011, 476, 163-169
- Bernheim A**. Cytogenomics of cancers: from chromosome to sequence. *Molecular oncology* 2010, 4(4), 309-322
- Bird MG**, Greim H, Kaden DA *et al.* Benzene 2009 – Health effect and mechanism of bone marrow toxicity: implication for t-AML and mode of action frame work. *Chem Biol Interac*, 2010, 19, 184(1-2), 3-6.
- Bishop DK**, Ear U, Bhattacharyya A *et al.* Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo. *J Biol Chem*, 1998, 273(34), 21482-21488.
- Block AW**, Carroll AJ, Hagemeyer A *et al.* Rare recurring balanced chromosome abnormalities in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002, 33(4), 401-412.
- Bloomfield CD**, Archer KJ, Mrózek K *et al.* 11q23 balanced chromosome aberrations in treatment-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002, 33(4), 362-378.
- Blow JJ**, Hodgson B. Replication licensing--defining the proliferative state? *Trends Cell Biol*, 2002, 12(2), 72-78.
- Boissel N**, Nibourel O, Renneville A *et al.* Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol*, 2010, 28(23), 3717-3723.
- Boulwood J**, Fidler C, Strickson AJ *et al.* Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood*, 2002, 99(12), 4638-4641.
- Boulukos KE**, Pongnong P, Sariban E *et al.* Rapid and transient expression of Ets2 in mature macrophages following stimulation with cMGF, LPS, and PKC activators. *Genes Dev*, 1990, 4(3), 401-409.

Bowen DT, Frew ME, Hills R *et al.* RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*, 2005, 106(6), 2113-2119.

Brem R, Hall J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(8), 2512-2520.

Breems DA, WMJ Van Putten, De Greef GE *et al.* Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol*, 2009, 26(29), 4791-4797.

Bullinger L, Fröhling S. Array based cytogenetic approaches in acute myeloid leukemia: clinical impact and biological insights. *Semin Oncol*, 2012, 39(1), 37-46.

Buttita F, Marchetti A, Gadducci A *et al.* p53 alterations are predictive of chemoresistance and aggressiveness in ovarian carcinomas: a molecular and immunohistochemical study. *Br J Cancer*, 1997, 75(2), 230-235.

Calin GA, Croce CM. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene*, 2006, 25(46), 6202–6210.

Casas S, Avenirin A, Fuentes F *et al.* Genetic diagnosis by comparative genomic hybridization in adult de novo acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004, 153(1), 16-25.

Castillo P, Bogliolo M, Surales J. Coordinated action of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia pathways in response to oxidative damage. *DNA Repair*, 2011, 10(5):518-525.

Chaney SG, Sancar A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst*, 88(19), 1346-1360.

Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I *et al.* Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res*, 2010, 34(1), 63-68.

Chen FX, Zhang Y, Church KM *et al.* DNA crosslinking, sister chromatid exchange and cytotoxicity of N-2-chloroethylnitrosoureas tethered to minor groove binding peptides. *Carcinogenesis*, 14(5), 929-933.

Chen CZ, Li L, Lodish HF, *et al.* MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, 303(5654), 83–86.

Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood*, 2004, 104(5), 1474–1481.

Codrington R, Panell R, Forster A *et al.* The Ews-ERG fusion protein can initiate neoplasia from lineage-committed haematopoietic cells. *PloS Biol*, 2005, 3(8) : e242.

Cochran BJ, Croucher DR, Lobov *et al.* Dependence on endocytic receptor binding via a minimal binding motif underlies the differential prognostic profiles of Serpin E1 and Serpin E2 in cancer. *J Biol Chem*, 2011, 286(27), 24467-24475.

Coiteux V, Onclercq-Delic R, Fenaux P *et al.* Predisposition to therapy-related leukemia with balanced chromosomal translocations does not result from a major constitutive defect in DNA double-strand break end joining. *Leuk Research*, 2007, 31, 353-358.

Croucher DR, Saunders DS, Lobov S, Ranson M. Revisiting the biological roles of PAI2 (SERPINB2) in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(7), 535-545.

Curtis RE, Boice JD Jr, Stovall M *et al.* Risk of leukemia after chemotherapy and radiation treatment for breast cancer. *N Engl J Med*, 1992, 326(26), 1745-1751.

D'Alò F, Fianchi L, Fabiani E *et al.* Similarities and differences between therapy-related and elderly acute myeloid leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2011, 3(1), e2011052

Dameshek W, Editorial-The Treatment of Polycythemia. *Blood*, 1946, 1, 256.

D'Amours D, Jackson SP. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*,. 2002, 3(5), 317-327.

Davies SM, Robison LL, Buckley JD, *et al.* Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2001, 19(5):1279-87.

Day III RS, Ziolkowski, Scudiero DA. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV-40-transformed human cell strains. *Nature*, 1980, 288(5792) 724-727.

Deambrogi C, De Paoli L, Fangazio M *et al.* Analysis of the REL, BCL11A, and MYCN proto-oncogenes belonging to the 2p amplicon in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, 2010, 85(7), 541-544.

Detourmignies L, Castaigne S, Stoppa AM, *et al.* Therapy related acute promyelocytic leukemia: a report on 16 cases. *J Clin Oncol*, 1992, 10(9), 1430-1435.

Ding Y, Harada Y, Imagawa J, *et al.* AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2009, 114(25), 5201-5205.

Dixon-McIver A, East P, Mein CA, *et al.* Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One*, 2008, 14, 3(5):e2141.

Döhner K, Tobis K, Ulrich R *et al.* Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol*, 2002, 20(15), 3254-3261.

Döhner K, Schlenk RF, Habdanck M *et al.* Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*, 2005, 106(12), 3740-3746.

Dumble R, Moore L, Chambers SM *et al.* The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood*, 2007, 109(4), 1736-1742.

Dupret C, Asnafi V, Leboeuf D, *et al.* IgH/TCR rearrangements are common in MLL translocated adult AML and suggest an early T/myeloid or B/myeloid maturation arrest, which correlates with the MLL partner. *Leukemia*, 2005, 19(12), 2337–2338.

Eklund EA. The role of HOX genes in malignant myeloid disease. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14(12) 85–89.

Eklund EA. Genomic analysis of acute myeloid leukemia :potential for new prognostic indicators. *Curr Opin Hematol*, 2010, 17(2), 75-78.

Ellisen LW, Carlesso, Cheng T *et al.* The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J*, 2001, 20(8), 1897-1909.

Engelward BP, Allan JM, Dreslin AJ *et al.* A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome. *J Biol Chem*, 1998, 273(9):5412-5418.

Erkizan HV, Uversky VN, Toretsky JA. Oncogenic partnerships: EWS-FLI1 protein interactions initiate key pathways of Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(16), 4077-4083.

Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, 2012, 87, 90-99.

Evers C, Beier M, Poelitz A, *et al.* Molecular definition of chromosome arm 5q deletion end points and detection of hidden aberrations in patients with myelodysplastic syndromes and isolated del(5q) using oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007, 46(12), 1119–1128.

Fabris S, Scarciolla O, Morabito F *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification and FISH to detect chromosomal abnormalities in CLL: a comparative study. *Genes Chromosomes Cancer*, 2011, 50(9), 726-734.

Falini B, Mecucci C, Tiacci E, M.D *et al.* Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med*, 2005, 352(3), 254-266.

Folley JH, Borges W, Yamawaki T. Incidence of leukemia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Am J Med*, 1952, 13(3), 311-321.

Fenske TS, McMahon C, Edwin D *et al.* Identification of candidate alkylator-induced cancer susceptibility genes by whole genome scanning in mice. *Cancer Res*, 2006, 66(10), 5029-5038.

Ferch U, Kloo B, Gewies A, *et al.* Inhibition of MALT1 protease activity is selectively toxic for activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*, 2009, 206(11), 2313–2320.

Forghieri F, Morcelli M, Potenza L et al. Chronic eosinophilic leukaemia with ETV6-NTRK3 fusion transcript in an elderly patient affected with pancreatic carcinoma. *Eur J Haematol*, 2011, 86(4), 352-355.

Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, et al. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie*, 2003, 85(11),1053-1071.

Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2001,1, 22-33

Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*, 2003, 421(6921),436-440.

Friedberg EC, Lehmann AR, Fuchs RP. Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell.*, 2005, 18(5), 499-505.

Fröhling S, Schlenk RF, Breitruk J et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*, 2002, 100(13), 4372-4380.

Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I 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, 22(4), 624-633.

Fuchs R, Tissier A. Réparation de l'ADN et cancer. *Cancérologie fondamentale*. John Libbey Eurotext, 2005 ; (Vol. 1.).

Gaillard JB, Chiesa J, Reboul D et al. Monosomal karyotype routinely defines a poor prognosis subgroup in acute myeloid leukemia is frequently associated with *TP53* deletion. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(2):336-337.

Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*, 2006, 12(12), 580–587.

Ginsberg JP, de Alava E, Ladanyi M, et al. EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol*, 1999, 17(6), 1809-1814.

Godley LA, Larson RA. Therapy related leukemia. *Semin Oncol*, 2008, 35(4), 418-429.

Golomb HM, Alimena G, Rowley JD, et al. *Blood*, 1982, 60(2), 404-411.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999, 286(5439), 531–537.

Golub TR, Barker GF, Lovett M et al. Fusion of PDGF receptor β to a novel *ets*-like gene, *tel*, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*, 1994, 77(2), 307-316.

Goth-Goldstein R Inability of chinese hamster ovary cells to excise O6-alkylguanine *Cancer Research*, 1980 40(7) 2623-2624

Goth R and Rajewsky MF. Persistence of O6 ethylguanine in rat brain DNA: correlation with nervous system and carcinogenesis by nitrosourea *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 1974,71(3) 639-643

Gout PW, Buckley AR, Simms CR, Bruchovsky N. Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the X(C)-cystine transporter: a new action for an old drug. *Leukemia*, 2001, 15(10)1633-1640.

Gorletta TA, Gasparini P, D'Elios MM *et al.* Frequent Loss of Heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes and Cancer* 2005, 44(3), 334-337.

Gordon MY, Kearney L and Hibbin JA. Effects of human bone marrow stromal cells proliferation by human granulocytic (GM-CFC), erythroid (BFU-E) and mixed (Mix-CFC) colony-forming cells. *Br J Haematol*, 1983, 53(2), 317-325.

Gross M, Mkrtchyan H, Glaser M, *et al.* Delineation of yet unknown cryptic subtelomere aberration in 50% of acute myeloid leukemia with GTG-banding karyotype. *Int J Oncol*, 2009, 34(2), 417-423.

Guillem V, Tormo M. Influence of DNA damage and repair upon the risk of treatment related leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49(2), 204-217.

Gwak J, Jung SJ, Kang DI *et al.* Stimulation of protein kinase C-alpha suppresses colon cancer cell proliferation by down-regulation of beta-catenin. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B), 2171-2180.

Haferlach C, Dicker F, Herholz H *et al.* Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, 2008, 22(8), 1539-1541.

Han Y, Chen J, Zhao X *et al.* MicroRNA expression signatures of bladder cancer revealed by deep sequencing. *PloS One*, 2011, 28, 6(3):e18286.

Harada H, Harada Y, Tanaka H *et al.* Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood*, 2003, 101(2), 673-680.

Harada Y and Harada H. Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML1/RUNX1 point mutations. *J Cell Physiol*, 2009, 220(1), 16-20.

Harada Y and Harada H. Molecular mechanisms that produce secondary MDS/AML by RUNX1/AML1 point mutations. *J Cell Biochem*, 2011, 112(2), 425-438.

Hart AH, Corrick CM, Tymms MJ *et al.* Human ERG is a proto-oncogene with mitogenic and transforming activity. *Oncogene*, 1995, 10(7), 1423-1430.

Havelange V, Garzon R, Croce CM. MicroRNAs: new players in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer*, 2009, 101(5), 743-748.

Hayata I, Ishihara T, Hirashima K *et al.* Partial deletion of chromosome No. 2 in myelocytic leukemias of irradiated C3H/He and RFM mice. *J Natl Cancer Inst*, 1979, 63(3), 843-848.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1995, 30(6), 445-600.

Heinrichs S, Li C, Look AT. SNP array in hematologic malignancies: avoiding false discoveries. *Blood*, 2010, 115(21), 4157-4161.

Ho PA, Alonzo TA, Kopecky KJ *et al.* Molecular alterations of the IDH1 gene in AML: a Children's Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *Leukemia*, 2010, 24(5), 909-913.

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 2001, 411(6835), 366-374.

Hu X, Stern MH, Ge L, *et al.* Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(4), 511-522.

Huret JL. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.

Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, *et al.* Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature*, 2001, 410(6832), 1111-1116.

Joslin JM, Fernald AA, Tennant Tr *et al.* Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood*, 2007, 110(2), 719-726.

Joung JY, Lee YS, Park S *et al.* Haplotype analysis of prostate stem cell antigen and association with prostate cancer risk. *J Urol*, 2011, 185(6), 2112-2118.

Kaina B, van Zeeland AA, de Groot A *et al.* DNA repair and chromosomal stability in the alkylating agent-hypersensitive Chinese hamster cell-line 27-1 *Mutation Research*, 243(3) 219-224.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992, 258(5083), 818-821.

Kalra R, Paderanga D, Olson K *et al.* Genetic analysis is consistent with the hypothesis that *NF1* limits myeloid cell growth through p21^{ras}. *Blood*, 1994, 84(10), 3435-3439.

Karp X, Ambros V. Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science*, 2005, 310(5752), 1288-1289.

Karran P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs *Carcinogenesis*, 2001, 22(12) 1931-1937.

Katzaki E, Morin G, Pollazzon M *et al.* Syndromic mental retardation with thrombocytopenia due to 21q22.11q22.12 deletion: Report of three patients. *Am J Med Genet A*; 2010, 152A(7):1711-1717.

Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, *et al.* Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia*, 1999, 13(5), 687–698.

Kayser S, Döhner K, Krauter J, *et al.* The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*, 2011, 117(7), 2137-2145.

Kayser S, Zucknick M, Döhner K *et al.* Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: prognostic impact and outcome after different treatment strategies. *Blood*, 2012, 119(2), 551-558.

Kim MH, Stewart J, Delvin C *et al.* The application of comparative genomic hybridization as an additional tool in the chromosome analysis of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001, 126(1), 26-33.

Kittang AO, Hatfield K, Sand K *et al.* The chemokine network in acute myelogenous leukemia: molecular mechanisms involved in leukemogenesis and therapeutic implications. *Curr Top Microbio Immunol*, 2010, 341:149-172.

Kondo N, Takahashi A, Ono K *et al.* DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways *J of Nucleic Acids*, 2010: 543531.

Kosmider O, Delabesse E, Mas VM *et al.* TET2 mutations in secondary acute myeloid leukemias: a French retrospective study. *Hematologica*, 2011, 96(7), 1059-1063

Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME *et al.* The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 2001, 98(6), 1752-1759.

Kralik JM, Kranewitter W, Boesmueller H *et al.* Characterization of a newly identified ETV6-NTRK3 fusion transcript in acute myeloid leukemia. *Diagn Pathol*, 2011, 6, 19.

Kruse EA, Loughran SJ, Baldwin TM *et al.* Dual requirement for the ETS transcription factors Fli-1 and Erg in hematopoietic stem cells and the megakaryocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 106(33), 13814-13819.

Kurz EU, Lees-Miller SP. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)*, 2004, 3(8-9), 889-900.

Kühn MWM, Radtke I, Bullinger L *et al.* High-resolution genomic profiling of adult and pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*, 2012, 119(10), e67-e75.

Lai F, Godley LA, Joslin J *et al.* Transcript map and comparative analysis of the 1.5-Mb commonly deleted segment of human 5q31 in malignant myeloid diseases with a del(5q). *Genomics*, 2001, 71(2):235-245.

Lange RD, Moloney WC, Yamawaki T. Leukemia in Atomic Bomb Survivors: I. General Observations. *Blood*, 1954, 9(6), 574-585.

- Langer T**, Metzler M, Reinhardt D, et al. Analysis of t(9;11) chromosomal breakpoint sequences in childhood acute leukemia: almost identical MLL breakpoints in therapy-related AML after treatment without etoposide. *Genes Chromos Cancer*, 2003, 36, 393-401.
- Lannon CL**, Sorensen PH. ETV6-NTRK3: a chimeric protein tyrosine kinase with transformation activity in multiple cell lineages. *Semin Cancer Biol*, 2005, 15(3), 215-223.
- Lakhanpal GK**, Vecchiarelli-Federico LM, Li YJ, et al. The inositol phosphatase SHIP-1 is negatively regulated by Fli-1 and its loss accelerates leukemogenesis. *Blood*, 2010, 116(3), 428-436.
- Larsen AK**, Escargueil AE, Skladanowski A. From DNA damage to G2 arrest: the many roles of topoisomerase II. *Prog Cell Cycle Res*, 2003, 5, 295-300.
- Larson RA**, Le Beau MM, Ratain MJ, Rowley JD. Balanced translocations involving chromosome bands 11q23 and 21q22 in therapy-related leukemia. *Blood*, 1992, 79(7), 1892-1893.
- Larson RA**, Wang Y, Banerjee M. Prevalence of the inactivating 609C-->T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood*, 1999, 94(2), 803-807.
- Larson RA**, Le Beau MM. Therapy-related myeloid leukemia. A model for leukemogenesis in humans. *Chemico-Biological Interactions*, 2005, (153-154), 187-195.
- Le Beau MM**, Albain KS, Larson RA, Vardiman et al. Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol*, 1986, 4(3), 325-345.
- Lejeune J**, Berger R, Haines M et al. Constitution d'un clone à 54 chromosome au cours d'une leucoblastose congénitale chez une enfant mongolienne. *CRAS*, 1963, 256, 1195-1197.
- Lemarchandel V**, Ghysdael J, Mognotte V et al. GATA and Ets cis-acting sequences mediate megakaryocyte-specific expression. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(1), 668-676.
- Leone G**, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica*, 2007, 92(10), 1389-1398.
- Leprince D**, Gegonne A, Coll J, et al. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature*, 1983, 306(5941):395-397.
- Le Torielléc E**, Despouy G, Pierron et al. Haploinsufficiency of CDKN1B contributes to leukemogenesis in T-cell prolymphocytic leukaemia. *Blood*, 2008, 111(4), 2321-2328.
- Lewis EB**. Leukemia and ionizing radiation. *Science*, 1957, 125(3255), 965-972.
- Ley TJ**, Mardis ER, Ding L et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*, 2008, 456(7218), 66-72.

Li A, King J, Moro A et al. Overexpression of CXCL5 is associated with poor survival in patient with pancreatic cancer. *Am J Pathol*, 2011, 178(3), 1340-1349.

Licht JD. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene*, 2001, 20(40), 5660-5679.

Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.*, 2010, 79, 181-211.

Linck DC, Schuettpelz LG, Shen D et al. Identification of a novel TP53 cancer susceptibility mutation through whole-genome sequencing of a patient with therapy-related AML. *JAMA*, 2011, 305(15), 1568-1576.

Lieberman D, Meytes D, Schacked N et al. Hulan bone marrow fibroblast proliferation and GM-CFC colony formation in patients with acute leukemia. *Acta Haematol*, 1984, 72(5), 309-314.

Litchman MA. Is there an entity of chemically induced BCR-ABL positive chronic myelogenous leukemia? *The Oncologist*, 2008, 13(6), 645-654.

Little JB. Genomic instability and bystander effects: a historical perspective. *Oncogene*, 2003, 22(45), 6978-6987.

Liu L, Nakatsuru Y, Gerson SL. Base Excision Repair as a Therapeutic Target in Colon Cancer. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(9), 2985-2991.

Liu W, Lee HW, Liu Y et al. Olfactomedin 4 is a novel target gene of retinoic acid and 5-aza-2'-deoxycytidine involved in human myeloid leukemia cell growth, differentiation and apoptosis. *Blood*, 2010,116 (23), 4938-4947.

Liu XX, Li XJ, Zhaug B, et al. MicroRNA-26b is underexpressed in human breast cancer and induces cell apoptosis by targeting SLC7A11. *FEBS Lett*, 2011, 585(9), 1363-1367.

Liu Y, Elf SE, Miyata Y et al. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1), 37-48.

Loughran SJ, Kruse EA, Hacking DF et al. The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, 2008, (7), 810-819.

Lovett BD, Strumberg D, Blair IA et al. Etoposide Metabolites Enhance DNA Topoisomerase II Cleavage near Leukemia-Associated *MLL* Translocation Breakpoints. *Biochemistry*, 2001, 40 (5), 1159-1170.

Ludlum DB. DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal. *Mutat Res*, 1990, 233(1-2), 117-126.

Lui WO, Zeng L, Rehrmann V, et al. CREB3L2-PPARgamma fusion mutation identifies a thyroid signaling pathway regulated by intramembrane proteolysis. *Cancer Res*, 2008, 68(17), 7156-7164.

Ma Y, Lu H, Tippin B, *et al.* A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell.*, 2004, 16(5), 701-713.

MacKinnon RN, Kannourakis G, Wall M, Campbell LJ. A cryptic deletion in 5q31.2 provides further evidence for a minimally deleted region in myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet*, 2011, 204(4), 187-194.

MacKinnon RN, Selan C, Zordan A *et al.* CGH and SNP using DNA extracted from fixed cytogenetic preparations and long term refrigerated bone marrow specimens. *Mol Cytogenet* 2012, 2(5)10.

Malfuson JV, Konopacki J, fagot T *et al.* Therapy-related myeloproliferative neoplasm with ETV6-PDGFRB rearrangement following treatment of acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol*, 2011 Feb 25.

Mamuris Z, Prieur M, Dutrillaux B *et al.*, The chemotherapeutic drug melphalan induces breakage of chromosomes regions rearranged in secondary leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 1989, 37(1), 65-77.

Marcucci G, Maharry K, Wu YZ *et al.* IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*, 2010, 28(14), 2348-2355.

Mardis ER, Ding L, Dooling DJ *et al.* Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*, 2009, 361(11), 1058-1066.

Martinez-Ramerez A, Urioste M, Calasanz MH *et al.* Array comparative genomic hybridization analysis of myelodysplastic syndromes with complexe karyotypes. A technical evaluation. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003, 144(1), 87-89.

Mays AN, Osheroff N, Xiao Y, *et al.* Evidence for direct involvement of epirubicin in the formation of chromosomal translocation in t(15;17) therapy-related promyelocytic leukemia. *Blood*, 2010, 115(2) 326-330.

Meletis K, Wirta V, Hede SM, *et al.* p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development*, 2006, 133(2), 363-369.

Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(10), 714-723.

Midmer M, Haq R, Squire JA *et al.* Identification of NKIAMRE, the human homologue to the mitogen-activated protein kinase-/cyclin-dependent kinase-related protein kinase NKIATRE, and its loss in leukemic blasts with chromosome arm 5q deletion. *Cancer Res*, 1999, 59(16), 4069-4074.

Missen MA, Haylock D, Whitty G *et al.* Stage specific gene expression of serpins and their cognate proteases during myeloid differentiation. *Br J Haematol*, 1999, 135, 715-724

Mistry AR, Felix CA, Whitmarsh RJ *et al.* DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2005, 352(15), 1529-1538.

- Mitelman F**, Kaneko Y, Trent JM. Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. *Cytogenet Cell Genet*, 1990, 55(1-4), 358-386.
- Miyoshi H**, Shimizu K, Kozu T, *et al.* t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(23), 10431-10434.
- Monnier J**, Samson M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Lett*, 2010, 296(2), 144-149.
- Mori Y**, Olam AV, Cehg Y *et al.* Novel candidate colorectal cancer biomarkers identified by methylation microarray-based scanning. *Endocr Relat Cancer*, 2011, 18(4), 465-478.
- Mrózek K**, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*, 2004, 18(2), 115-136.
- Mrozek K**. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol*, 2008, 35(4), 365-377.
- Mullally A**, Enbert BL. NF1 inactivation represses Ras in adult acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(16), 4074-4076.
- Murr R**, Loizou JI, Yang YG, *et al.* Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA doublestrand breaks. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(1), 91-99.
- Naoe T**, Takeyama K, Yokozawa T. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(10), 4091-4095.
- Nguyen TT**, Ma LN, Slovak ML, *et al.* Identification of novel Runx1 (AML1) translocation partner genes SH3D19, YTHDF2, and ZNF687 in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006, 45(10), 918-932.
- Niebuhr B**, Fischer M, Täger M, *et al.* Gatekeeper function of the RUNX1 transcription factor in acute leukemia. *Blood Cells Mol Dis*, 2008, 40(2), 211-218.
- Nishiyama M**, Arai Y, Tsunematsu Y *et al.* 11p15 translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, 26(3), 215-220.
- Nowell PC**. The clonal evolution of tumor cell population. *Science*, 1976, 194(4260), 23-28.
- Osato M**. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene*, 2004, 23(24), 4284-4296.
- Panagopoulos I**, Storlazzi CT, Fletcher CD, *et al.* The chimeric FUS/CREB3L2 gene is specific for low-grade fibromyxoid sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004, 40(3), 218-228.
- Papas TS**, Watson DK, Sacchi N, *et al.* ETS family of genes in leukemia and Down syndrome. *Am J Med Genet Suppl*, 1990, 7, 251-261.

Park JY, Shigenaga MK, Ames BN. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(6), 2322-2327.

Parkin B, Erba H, Ouillet P, *et al.* Acquired genomic copy number aberrations and survival in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*, 2010, 116(23), 4958-4967.

Parkin B, Ouillet P, Wang Y, *et al.* NF1 inactivation in adult acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(16), 4135–4147.

Pasquali D, Santoro A, Bufo P, *et al.* Upregulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancers displaying infiltrative patterns, lymph node metastases, and BRAF mutation. *Thyroid*, 2011, 21(4), 391-399.

Patel KP, Ravandi F, Ma D *et al.* Acute myeloid leukemia with *IDH1* or *IDH2* mutation. *Am J Clin Pathol*, 2011, 135(1), 35-45.

Paulsson K, Heidenblad M, Strombeck B, *et al.* High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia*, 2006, 20(5), 840–846.

Pedersen-Bjergaard J, Philip P. Cytogenetic characteristics of therapy-related acute nonlymphocytic leukaemia, preleukaemia and acute myeloproliferative syndrome: correlation with clinical data for 61 consecutive cases. *Br J Haematol*, 1987, 66(2), 199-207

Pedersen-Bjergaard J, Philip P. Two different classes of therapy-related and de-novo acute myeloid leukemia? *Cancer Genet Cytogenet*, 1991, 55(1), 119-124.

Pedersen-Bjergaard J, Philip P. Balanced translocations involving chromosome band 11q23 and 21q22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following therapy with cytostatic agents targeting at DNA-topoisomerase II. *Blood*, 1991, 78(4), 1147-1148.

Pedersen-Bjergaard J, Brondum-Nielsen K, Karle H, Johansson B. Chemotherapy-related and late occurring Philadelphia chromosome in AML, ALL and CML. Similar events related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors? *Leukemia*, 1997, 11(9), 1571–1574.

Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Desta F, Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2006, 20(11), 1943-1949.

Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK. Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Am Soc Hematol Educ Program*, 2007, 392–397.

Pellagatti A, Esoof N, Watkins F *et al.* Gene expression profiling in the myelodysplastic syndromes using cDNA microarray technology. *Br J Haematol*, 2004, 125(5), 576-583.

Persson C, Canedo P, Machada JC *et al.* Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with gastric cancer: A HuGE systemic review and meta-analyses. *Am J of Epidemiol*, 2010, 173(3), 259-270.

Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 2000, 15(4), 289-302.

Pinkel D, Seagraves R, Sudar D *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 1998, 20(2), 207-211.

Polo SE and SP Jackson. Dynamics on DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on DNA modifications *Genes Dev*, 2011, 25(5):409-433

Preiss BS, Bergmann OJ, Friis LS *et al.* Cytogenetic findings in adult secondary acute myeloid leukemia (AML): frequency of favorable and adverse chromosomal aberrations do not differ from adult de novo AML. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 202(2), 108-122. *Erratum in: Cancer Genet Cytogenet*, 2011, 204(2), 111. Bergman, Olav J.

Preudhomme C, Warot-Loze D, Roumier C *et al.* High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. *Blood*, 2000, 96(8), 2862-2869.

Preudhomme C, Sagot C, Boissel N *et al.* Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*, 2002, 100(8), 2717-2723.

Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, *et al.* High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood*, 2009, 113(22), 5583-5587.

Quentin S, Cuccuini W, Ceccaldi R *et al.* Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood*, 2011, 117(15):e161-170

Quentmeier H, Dirks WG, Macleod RA, *et al.* (2004) Expression of HOX genes in acute leukemia cell lines with and without MLL translocations. *Leuk Lymphoma*, 2004, 45(3), 567-574.

Quesnel B, Kantarjian H, Pedersen-Bjergaard J, *et al.* Therapy-related acute myeloid leukemia with t(8;21), inv 16, and t(8;16). A report on 25 cases and review of the literature. *J Clin Oncol*, 1993, 11(12), 2370-2379.

Ratain MJ, Rowley JD: Therapy-related acute myeloid leukemia secondary to inhibitors of topoisomerase II: From the bedside to the target genes. *Ann Oncol*, 1992, 3(2), 107-111.

Ratain MJ, Kaminer LS, Bitran JD *et al.* Acute nonlymphocytic leukemia following etoposide and cisplatin combination chemotherapy for advanced non-small-cell-carcinoma of the lung. *Blood*, 1987, 70(5), 1412-1417.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 2006, 444(7118), 444-454.

Reiter RE, Sato I, Thomas G *et al.* Coamplification of prostate stem cell antigen (PSCA) and MYC in locally advanced prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 27(1), 95-103.

Reliene R, Bishop AJ, Schiestl RH. Involvement of homologous recombination in carcinogenesis. *Adv Genet*, 2007,58, 67-87.

Roumier C, Eclache V, Imbert M, *et al.* M0 AML, clinical and biologic features of the disease, including AML1 gene mutations: a report of 59 cases by the Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC) and the Groupe Francais de Cytogetique Hematologique (GFCH). *Blood*, 2003, 101(4), 1277–1283.

Rowley JD, Golomb HM and JW Vardiman. Acute leukemia after treatment of lymphoma. *N Engl J Med*, 1977, 297(18), 1013.

Rowley JD, Golomb HM and JW Vardiman. Nonrandom chromosome abnormalities in acute leukemia and dysmyelopoietic syndromes in patients with previously treated malignant disease. *Blood*, 1981, 58(4):759-767.

Rubin CM, Arthur DC, Woods WG *et al.* Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children: correlation between chromosomal abnormalities and prior therapy. *Blood*, 1991, 78(11), 2982-2988.

Rucker FG, Bullinger L, Schwaenen C, *et al.* Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J Clin Oncol*, 2006, 24(24), 3887–3894.

Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L *et al.* *TP53* alteration in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alteration, monosomal karyotype and dismal outcome. *Blood*, 2012, 119(9),2114-2121.

Santoro A, Maggio A, Carbone P, *et al.* Amplification of *ETS2* oncogene in acute nonlymphoblastic leukemia with t(6;21;18). *Cancer Genet Cytogenet*, 1992, 58(1), 71–75.

Sato Y, Suto Y, Pietenpol A *et al*, *TEL* and *KIP1* define the smallest region of deletions on 12p13 in hematopoietic malignancy. *Blood*, 1995, 86(4), 1525-1533.

Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, *et al.* Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(25), 12223–12227.

Savage JRK . An Introduction to Chromosomal Aberrations. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 1999 .URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/Chromaber.html>

Savage SA, Abnet CC, Mark SD *et al.* Variants of the *IL8* and *IL8RB* genes risk for gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(12), 2251-2257.

Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C *et al.* Genomic profiling of Richter's syndrome: recurrent lesions and differences with de novo diffuse large B-cell lymphomas. *Hematol Oncol*, 2010, 28(2), 62-67.

Scherrer A, Kruithof EK, Grob JP. Plasminogen activator inhibitor-2 in patients with monocytic leukemia. *Leukemia*, 1991, 5(6), 479-486.

Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. 2003, 3(3), 155-168.

Schmetzer HM, Braun S, Wiesner D, *et al.* Gene rearrangements in bone marrow cells of patients with acute myelogenous leukemia. *Acta Haematol*, 2000, 103(3), 125–134.

Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C *et al.* Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia*, 2000, 14(5), 796-804.

Schnittger S, Schoch C, Kern W *et al.* Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, 2005, 106(12), 3733-3739.

Schnittger S, Dicker F, Kern W *et al.* RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood*, 2011, 117(8), 2348-2357.

Schoch C, Haferlach T, Bursch S, *et al.* Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002, 35(1), 20–29.

Schoch C, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukaemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia*, 2004, 18(1), 120-125.

Schwind S, Maharry K, Radmacher MD *et al.* Prognostic significance of expression of a single microRNA, miR-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*, 2010, (36), 5257-5264

Seedhouse C, Bainton R, Lewis M *et al.* The genotype distribution of the *XRCC1* gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 2002, 100(10), 3761-3766.

Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, *et al.* Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(8), 2675-2680.

Seedhouse C, Russell N. Advances in the understanding of susceptibility to treatment-related acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 2007, 137(6), 513-529.

Sementchenko VI, Schweinfest CW, Papas TS *et al.* ETS2 function is required to maintain the transformed state of human prostate cancer cells. *Oncogene*, 1998, 17(22), 2883-2888.

Sevignani C, Wlodarski P, Kirilova J *et al.* Tumorigenic conversion of p53-deficient colon epithelial cells by an activated Ki-ras gene. *J Clin Invest*, 1998, 101(8), 1572-80.

Shannon KM, O'Connell P, Martin GA, *et al.* Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med*, 1994, 330(9), 597-601.

Silberberg DH, Frohman LA, Duffy IF. The incidence of leukemia and related diseases in patients with rheumatoid (ankylosing) spondylitis treated with x-ray therapy. *Arthritis Rheum*, 1960, 3, 64-75.

Silva FP, Almeida I, Morolli B *et al.* Genome wide molecular analysis of minimally differentiated acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 2009, 94(11), 1546-1554.

Skjelbred CF, Saebo M, Hjartaker A, *et al.* Meat, vegetables and genetic polymorphisms and the risk of colorectal carcinomas and adenomas. *BMC Cancer*, 2007, 7, 228.

Smith AG, Worrillow LJ, Allan JM. A common genetic variant in XPD associates with risk of 5q- and 7q-deleted acute myeloid leukaemia. *Blood*, 2007, 109(3), 1233-1236.

Smith SM, Le Beau MM, Huo D *et al.* Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*, 2003, 102(1), 43-52.

Sobol RW, Horton JK, Kühn R. Requirement of mammalian DNA polymerase beta in base excision repair. *Nature*, 1996, 379(6561), 183-186.

Sobol RW, Prasad R, Evenski A *et al.* The lyase activity of the DNA repair protein β -polymerase protect from DNA damage-induced cytotoxicity *Nature*, 2000, 405(6788) 807-810

Song HR, Kim HR, Piao JM *et al.* Association of a common genetic variant in prostate stem-cell antigen with gastric cancer susceptibility in a Korean population. *Mol Carcinol*, 2011, May 2. doi: 10.1002/mc.20796. [dernière consultation 19/09/2011]

Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, *et al.* Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*, 1999, 23(2), 166-175.

Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM *et al.* Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO*, 1998, 17(2), 598-608.

Sreeja L, Syamala V, Hariharan S, *et al.* Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms: susceptibility and outcome in lung cancer patients. *J Exp Ther Oncol*, 2008, 7(1), 73-85.

Stankiewicz MJ, Crispino JD. ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 2009, 113(14), 3337-3347.

Stanulla M, Wang J, Chervinsky DS, Aplan PD. Topoisomerase II inhibitors induce DNA double-strand breaks at a specific site within the AML1 locus. *Leukemia*, 1997, 11(4), 490-496.

Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(6):a000109.

- Stein GS**, van Wijnen AJ, Stein JN *et al.* An architectural perspective of cell-cycle control at the G1/S phase cell-cycle transition. *J Cell Physiol*, 2006 Dec;209(3):706-10.
- Stingerland J**, Pagano M, Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol*, 2000, 183(1), 10-17.
- Stockwin LH**, Vistica DT, Kenney S, *et al.* Gene expression profiling of alveolar soft-part sarcoma (ASPS). *BMC Cancer*, 2009, 9:22.
- Stojic L**, Brun R *et al.* Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair* 2004, 3(8-9), 1091-1101.
- Storlazzi CT**, Fioretos T, Surace C, Lonoce A, *et al.* MYC-containing double minutes in hematologic malignancies: evidence in favor of the episome model and exclusion of MYC as the target gene. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(6), 933–942.
- Stracker TH**, Theunissen JW, Morales M, *et al.* The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst)*., 2004, 3(8-9), 845-854.
- Suela J**, Alvarez S, Cigudosa JC. DNA profiling by arrayCGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cytogenet Genome Res*, 2007, 118(2-4), 304–309.
- Summers K**, Stevens J, Kakkas I *et al.* Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML *Leukemia*, 2007, 21(3):550-1.
- Super HJ**, McCabe NR, Thirman MJ *et al.* Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood*, 1993, 82(12), 3705-3711.
- Suzen HS**, Guvenc G, Turanli M, *et al.* The role of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in head and neck cancer risk. *Oncol Res*, 2007, 16(9), 423–429.
- Suzuki K**, Sun R, Origushi M *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Promote Tumor Growth Through the Enhancement of Neovascularization. *Mol Med*, 2011, 17(7-8):579-587.
- Takahashi T**, Harada S, Oki M, *et al.* Acute myelogenous leukemia with monosomy 7 in a Hiroshima survivor 60 years after the atomic bomb. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 170(2), 182-183.
- Tebbs RS**, Zhao Y, Tucker JD *et al.* Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(14), 6354-8.
- Tekippe M**, Harrison DE, Chen J. Expansion of hematopoietic stem cell phenotype and activity in Trp53-null mice. *Exp Hematol*, 2003, 31(6), 521-527.
- Tewey KM**, Chen GL, Nelson EM *et al.* Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem*, 1984, 259(14), 9182-9187.

Thiede C, Steudel C, Mohr B *et al.* Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 2002, 99(12), 4326-4335.

Thiede C, Koch S, Creutzig E *et al.* Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2006, 107(10), 4011-4020.

Thiel A, Beier M, Ingenhag D *et al.* Comprehensive array CGH of normal karyotype myelodysplastic syndromes reveals hidden recurrent and individual genomic copy number alterations with prognostic relevance. *Leukemia*, 25(3), 387-399.

Thirman MJ, Larson RA. Therapy-related myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1996, 10(2), 293-320.

Thompson LH et Hinz JM Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication coupled DNA repair:mechanistic insight *Mutation Research*, 2009, 668(1-2) 54-72.

Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, *et al.* Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood*, 2002, 99(1), 121–129.

Tihiliani M, Koh KP, Shen Y, *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, 324(5929), 930-935.

Toujani S, Dessen P, Itzhar N, *et al.* High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *PloS One*, 2009, 4(9):e7089.

Tyburczy ME, Kolutska K, Pakarowski P, *et al.* Novel proteins regulated by mTOR in subependymal giant cell astrocytomas of patients with tuberous sclerosis complex and new therapeutic implications. *Am J Pathol*, 2010, 176(4), 1878-1890.

Tyybakinoja A, Elonen E, Piippo K, *et al.* Oligonucleotide array-CGH reveals cryptic gene copy number alterations in karyotypically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2007, 21(3), 571–574.

Tzusuki S, Taquchi O, Seto M. Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood*, 2011, 117(14), 3858-3868.

Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W *et al.* Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*, 2005, 106(12), 3747-3754.

Wada H, Kumeda Y, Ogazawara Z *et al.* Plasminogen activators and their inhibitors in leukemic cell homogenates. *Am J Hematol*, 1993, 42(2), 166-170

Wagner K, Damm F, Göhring G *et al.* Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*, 2010, 28(14), 2356-2364.

- Wald N.** Leukemia in Hiroshima City Atomic Bomb Survivors. *Science*, 1958, 28, 127(3300), 699-700.
- Walter MJ,** Payton JE, Ries RE, *et al.* Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(31), 12950–12955.
- Walter MJ,** Shen D, Ding, L *et al.* Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Eng J Med*, 2012, 366, 1090-1098.
- Wang J,** Xiang G, Mitchelson K *et al.* Microarray profiling of monocytic differentiation reveals miRNA-mRNA intrinsic correlation. *J Cell Biochem*, 2011, 112(9):2443-2453.
- Wang LC,** Swat W, Fujiwara Y, *et al.* The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev*, 1998, 12(15), 2392-23402.
- Ward PS,** Patel J, Wise DR *et al.* The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*, 2010, 17(3), 225-234.
- Wattel E,** Preudhomme C, Hecquet B, *et al.* p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, 1994, 84(9), 3148-3157.
- Welch JS,** Westervelt P, Ding L *et al.* Use of Whole-Genome Sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogen. *JAMA*, 2011, 305(15), 1577-1584.
- Welch JS,** Link DC. Genomics of AML: Clinical applications of next generation sequencing. *Hematology*, 2011, 30-35.
- Whitehouse CJ,** Taylor RM, Thistlethwaite A, *et al.* XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell*, 2001, 104(1), 107-117.
- Wong KK,** de Leeuw RJ, Dosanjh NS, *et al.* A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *A J Hum Genet*, 2007, 80(1), 91-104.
- Woo KS,** Kim KE, Kim Kh *et al.* Deletions of chromosome arms 7p and 7q in adult acute myeloid leukemia: a marker chromosome confirmed by array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 2009, 194(2), 71-74.
- Worrillow LJ,** Travis LB, Smith AG *et al.* An intron splice acceptor polymorphism in hMSH2 and risk of leukemia after treatment with chemotherapeutic alkylating agents. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(8), 3012-3020.
- Worrillow LJ,** Allan JM. Deregulation of homologous recombination DNA repair in alkylating agent-treated stem cell clones: a possible role in the aetiology of chemotherapy-induced leukaemia. *Oncogene*, 2006, 25(12), 1709-1720.
- Xu-Welliver M,** Pegg AE. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 2002, 23(5):823-830.

Yan M, Burel SA, Peterson LF, *et al.* Deletion of an AML1-ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(49), 17186-17191.

Zaldumbide A, Carlotti F, Pognonec P *et al.* The role of the Ets2 transcription factor in the proliferation, maturation, and survival of mouse thymocytes. *J Immunol*, 2002, 169(9), 4873-4881.

Zhang J, Guo H, Zhang H, *et al.* Putative tumor suppressor miR-145 inhibits colon cancer cell growth by targeting oncogene Friend leukemia virus integration 1 gene. *Cancer*, 2011, 117(1), 86-95.

Zhang Y, Strissel P, Strick R, Chen J *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 U S A*, 2002, 99(5), 3070-3075.

Zhao Z, Zuber J, Diaz-Flores E *et al.* p53 loss promotes acute myeloid leukemia by enabling aberrant self-renewal. *Genes Dev*, 2010, 24(13), 1389-1402

Zilfou JT *et al.* Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(5):a001883.

Zochodne B, Truong HA, Stetler K *et al.* Epo regulates erythroid proliferation and differentiation through distinct signaling pathways: implication for erythropoiesis and Friend virus-induced erythroleukemia. *Oncogene*, 2000, 19(19), 2296-22304.

Zuber J, Radtke I, Pardee Ts *et al.* Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes Dev*, 2009, 23(7), 877-889.

ANNEXES

Tableau 11

Tableau 12

Tableau 13

Tableau 14

Tableau de Wong et al, 2007 [*Wong KK et al, J Clin Oncol, 2007*]

Figure7

Tableau 11 – Gains et pertes de CNA des t-LAM et leur caryotype révisé après étude en aCGH 244K

P	GAINS	PERTES	CARYOTYPE RÉVISÉ
t-2	+14q11.2q12<24.09-26.24>[1.23] +14q12q13.3<29.52-35.74>[1.26] +14q21.1q21.2<41.52-44.69>[1.23] +14q21.3q22.1<47.25-52.51>[1.54]	-1q44<241.94-247.19>[0.61] -5q14.3q35<85.18-167.84>[0.58] -7pterp22.3<0.14-2.67>[0.65] -7p21.3<8.21-11.79>[0.64] -7p15.2q14.3<27.40-33.28>[0.67] -7p14.1q33<39.89-135.74>[0.63] -7q33q34<135.74-137.48>[0.16] -7q34qter<137.48-158.76>[0.60] -12p13p11.2<11.27-25.37>[0.61] -12p11.2q12<32.77-37.09>[0.65] -12q13.1<47.09-49.44>[0.66] -12q13.3q22<55.30-92.75>[0.63] -12q23.3<105.58-107.51>[0.68] -14q11.2<23.73-24.07>[0.70] -14q12<26.25-27.10>[0.65] -14q21.2<35.77-37.62>[0.66] -14q21.2<44.69-45.26>[0.66] -18q11.1q11.2<16.79-21.74>[0.59] -18q11.2q12.1<21.74-24.41>[0.22] -18q12.1q22.3<24.41-71.05>[0.59] -18q22.3q23<71.06-71.76>[0.23] -18q23<71.76-76.11>[0.59]	44,XX,-1q44,-5q14.3q35,-7,-7q33q34,-12p11.2p13.2, -12p11.2q12,-12q13.1,-12q13.3q22,-12q23.3, -14q12,+14q12,-14q12,+14q12q13.3, -14q21.2,+14q21.1q21.2,-14q21.2,+14q21.3q22.1, -18q11.1qter,-18q11.2q12.1, -18q22.3q23
t-24	+17q11.1qter<22.80-78.65>[1.39] +19p13.3<4.96-6.82>[1.44]	-2p11<89.65-91.05>[0.62]* -17pterp11.2<0.28-21.22>[0.63] -19p13.3<0.21-4.96>[0.60]	46,XX,t(11;?)(q23;?),i(17)(q10),-19p13.3,+19p13.3
t-8	+13q11qter<18.36-114.10>[1.46]	-7q31.1q36.1<107.67-150.28>[0.55] -21q22.1<35.01-35.60>[0.11] - Xp11.4<39.25-39.85>[0.16]	47,XY,-Xp11.4,-7q31.1q36.1,+13,-21q22.1
t-13	+2p16.1p25.3<0.02-54.88>[1.46]	-1q42.3.q44<233.13-247.19>[0.53] -10q11.2<45.53-47.97>[0.78]	46,XX,der(1)t(1;2)(q42.3;p16.1),-10q11.2
t-30		-2p23.3<25.31-25.60>[0.50] -14q32.3<105.96-106.00>[0.65]* -2p11<88.98-91.05>[0.46]*	46,XY,-2p23.3
t-15	+8pterqter<0.16-146.26>[1.31] +17pterqter<0.02-78.65>[1.31]	-4q31.2<146.62-146.67>[0.68] -14q32.3<105.40-106.15>[0.34]*	46,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),+17

Tableau 11 - Suite

P	GAINS	PERTES	CARYOTYPE REVISE
t-4	+2q14.3q32.3<128.11-193.87>[1.34] +7q11.2q36.3<61.46-158.81>[1.65] +12p12.1 p11.2<24.32-30.60>[1.37]	-1p36.11<26.73-27.04>[0.64] -1q43<237.92-238.50>[0.62] -5q31.1q33.1<142.91-148.19>[0.63] -7p11.1p22.3<0.14-57.89>[0.65] -12pterp12.1<0.05-21.96>[0.63] -14q32.3<105.13-105.84>[0.68]* -15q11.2q21.3<20.24-55.80>[0.65] -17p13.3p11.2<0.02-22.07>[0.65] -17q22<51.84-54.75>[0.64]	46,XX,dup(2)(q14.3q32.3),t(5;13)(p15;q14),-5q31.3q32,+i(7)(q10),der(7)t(7;15)(q10;q21.3),der(12)t(12;17)(p12.1;q11),+12p11.2p12.1,-15pterq21.2,-17p11.2p13.3,-17q23.2
t-16	+7p15.2<27.15-27.18>[1.33] +8q24.2q24.3<139.48-140.18>[1.46]	Pas de CNA	46,XX,+7p15.2,+8q24.2q24.3,inv(16)(p13;q22)
t-23	+4q35.1q35.2<187.17-187.37>[1.49]	-14q32.3<106.21-106.25>[0.66]*	46,XX,+4q35.1q35.2,t(11;19)(q23;q13)
t-17	+7p15.2<27.15-27.18>[1.26] +6q27<168.12-168.84>[1.20]	-2p11<89.10-89.89>[0.70]* -3p12.3p14.1<69.07-79.19>[0.54] -14q32.3<105.85-105.89>[0.59]*	-3p12.3p14.1,+7p15,t(15;17)(q22;q21)⁺.ish(PML;RARA)
t-29	Pas de CNA	-14q32.3<105.94-106.00>[0.66]* -21q22.1<34.98-35.29>[0.59]	46,XY,-21q22.1
t-3	+8q24.3<143.73-143.90>[1.50]	-14q32.3<104.96-105.22>[0.76]*	46,XX,t(1;17)(p36;?),t(7;?) (p15;?),+8q24.3,t(7;10;17)(?;p11;q21;?)
t-26	+2q11.2<98.43-98.63>[1.42]	Pas de CNA	46,XX,+2q11.2
t-12	+21q22.1qter<35.07-46.91>[1.19]	-7q22.1q36.3<101.85-158.79>[0.80]	46,XY,-7q22.1q36.3,t(8;21)(q22;q22),+21q22.1qter
t-9	+4p16.3<1.20-1.30>[1.38] +6q27<168.08-168.32>[1.50]	-7pterqter<0.14-158.76>[0.56]	45,XY,+4p16.3,-7
t-11	Pas de CNA	-21q22.12<35.11-35.15>[0.68]	46,XY,-21q22.12
t-14	+7p15.2<27.15-27.18>[1.38] +8pterq24.3<0.16-142.23>[1.35] +8q24.3<142.23-145.81>[1.52] +8q24.3<145.81-146.26>[1.35]	-14q32.3<105.96-106.00>[0.60]* -17q11.2<25.96-27.38>[0.72]	47,XX,+7p15,+8,-17q11.2
t-1	Pas de CNA	-5q15qter<94.36-177.87>[0.79]	57,XXX,+1,+4,del(5)(q15q33)x2,-7,+8,+9,+der(11)+13,+14,-17,+18,+19,-20,+22,+mar
t-5	+5p15.2p14.3<10.78-21.71>[1.27] +5p13.3q11.2<31.24-53.59>[1.31] +21q22.1<36.40-36.53>[1.60]	-3p14.1p12.3<69.67-80.18>[0.54] -5pterp15.2<0.09-10.76>[0.57] -5q12.3qter<65.23-180.64>[0.57] -7pterp11.1<0.14-57.66>[0.57] -7q21.3q36.3<97.13-158.76>[0.57] -12p13.2p13.1<11.82-13.33>[0.62]	46,XY,-3p12.2p14.1,-5p15.2pter,+5 p14.3p15.2,+5p12q12.3,-5q12.3qter,-7p11.1p22.3,-7q21.3q32.1,-12p13.1p13.2,+21q22.1

Tableau 11 – Suite

P	GAINS	PERTES	CARYOTYPE RÉVISÉ
t-10	+1q44<246.44-247.06>[1.32]	-7p22.2<3.02-3.12>[0.48] -7q11.2<64.40-75.85>[0.77] -7q21.3q22.1<97.69-101.88>[0.77]	46,XY,+1q44,-7p22.2,-7q11.2,-7q21.3q22.1
t-7	+9q34.3<135.98-139.80>[1.30] +12p13.1<14.25-14.61>[1.36] +12p11.1<31.55-34.64>[1.34] +12q13.1q14.3<47.69-51.83>[1.42] +12q14.1q14.3<58.80-64.31>[1.33] +21q21.2q21.3<23.17-30.35>[1.42] +21q22.1q22.3<36.20-43.01>[1.58]	-7pterqter<0.14-158.81>[0.79] -12q12<36.73-42.14>[0.65] -12q13.1<45.33-47.69>[0.68] -17pterp11.3<0.02-21.23>[0.78] -21q21.1q21.2<19.84-23.05>[0.65] -21q22.1<34.38-36.12>[0.66] -21q22.3<43.02-43.08>[0.65]	45,XY,-7,+9q34.3,+12p13.1,+12p11.1,-12q11q12,-12q13.1,+12q13.12q14.3,-17p11.2p13.3,-21q21.1q21.2,+21q21.2q21.3,-21q22.1q22.12,+21q22.12q23,-21q22.3
t-6		-7pterqter<0.14-158.76>[0.70]	45,XY,t(2;6)(q12;q21),-7
t-22	+2p25.2<2.54-3.57>[1.37] +8pterqter<0.16-146.26>[1.40]	Pas de CNA	46,XY,+2p25.3,+8,t(9;11)(p21;q23)
t-19	+7p15.2<27.15-27.18>[1.40]	Pas de CNA	46,XX,+7p15.2,t(9;11)(p22;q23)
t-21	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX,t(9;11)(p22;q23)
t-20	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX,t(11;19)(p22;q23)
t-18	Pas de CNA	-14q32.3<105.94-106.00>[0.64]*	46,XX,t(15;17)(q22;q21)
t-25	Pas de CNA	-2p11<89.10-91.05>[0.69]*. -14q32.3<105.96-106.00>[0.61]*	46,XX
t-27	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX
t-28	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX

Les valeurs entre crochets correspondent aux log ratios linéaires des CNA ou de leur moyenne, lorsque l'ensemble du CNA est étendu sur plusieurs oligonucléotides

Tableau 12 - Gains et pertes de CNA des t-LAM et leur caryotype révisé après aCGH 2x400K

P	GAINS	PERTES	CARYOTYPE RÉVISÉ
t-jal	8q24.3<141.65-141.72>, 21q11.2q22.3<14.31-46.92>	7pterqter, 18p11.3p11.2<0.00-14.11>	46,XX,-7,+8q24.3<141.65-141.72>, der(18)t(18;21)(p11;q21),-18p11.3p11.2<0.00-14.11>,+ 21q11.2q22.3<14.31-46.92>
t-pic	1q21.1q44<142.72-247.18>, 16p13.1<15.01-15.42>	1q25.2<177.36-177.48>	ish der(?13)t(1;13),+1q21.1q44<142.72-247.18>, -1q25.2<177.36-177.48>+16p13.1<15.01-15.42>
t-pio	4p16.3p15.2<0.071-24.11>, 7p15.2<27.13-27.17>, 11q14.3q22.3<91.74-105.27>[1,50]*, 11q22.3<105.28-106.74> [3,28]*, 11q22.3q25<106.75-134.45>[3,00]* 12q24.3<131.42-131.70>, 22q11.2<21.33-21.98>, Xq12<67.49-67.53>	3p26.3p24.3<0.037-17.33>, 3p24.3<17.33-18.40>, 3p24.3p14.1<18.41-71.50>, 5p15.3q11.1<0.14-49.67>, 5q13.2q35.3<72.42-180.64>, 7q31.3q34<119.08-141.43>, 7q34<141.44-141.46>, 7q34q36.3<141.46-158.81>, 12p13.3<0.093-6.83>, 12p13.3p12.1<9.04-23.77>	44~45,XY,der(3),-3p26.3p24.3<0.037-17.33>,-3p24.3<17.33-18.40>, -3p24.3p14.1<18.41-71.50>,+4p16.3p15.2<0.071-24.11>, +der(5)qdp(11)(q22q24),-5p15.3q11.1<0.14-49.67>, -5q13.2q35.3<72.42-180.64>,+7p15.2<27.13-27.17>, -7q31.3q34<119.08-141.43>,-7q34<141.44-141.46>, -7q34q36.3<141.46-158.81>, +11q14.3q22.3<91.74-105.27>*,+11q22.3<105.28-106.74>*, +11q22.3q25<106.75-134.45>*,-12p13.3<0.093-6.83>, der(12)t(3;12)(q11;p12),-12p13.3p12.1<9.04-23.77>, +22q11.2<21.33-21.98>,+Xq12<67.49-67.53>
t-bri	Pas de CNA	7q31.1q36.3<111.94-158.27>, 8p22<16.03-16.09>	46,XX,-7q31.1q36.3<111.94-158.27>, -8p22<16.03-16.09> , inv(16)(p13q22)
t-abo	8q24.3<145.08-145.09>, 10q22.3<77.95-77.96>, 11p15.2<15.02-15.05>	Pas de CNA	46,XX,inv(11)(p15q22)[8]/46,XX,sl,i(17)(q10)[2]/46,sdl1,ins(1;20)(p32;q12), del(20)(q12q13)[20] ish:perte de p53 46,XX, inv(11)(p15q22),+ 8q24.3<145.08-145.09> ,
t-gir	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY

Tableau 13 - Gains et pertes de CNA des p-LAM et leur caryotype révisé après aCGH 244K

P	GAINS	PERTES	CARYOTYPE RÉVISÉ
p-24	+1p36.3<1.52-7.56>[1.26] +1q21q22<153.19-154.64>[1.67] +3p21.3<50.26-50.29>[2.54] +3p21.3<52.29-52.31>[4.00] +4p16.3<0.99-1.65>[1.61] +15q22.2q23<56.84.18-67.10>[2.05] +15q23<67.44-68.37>[3.64] +15q24.1<70.42-72.67>[2.89] +15q24.1q26.2<72.70-94.54>[1.30] +16q23.3q24.3<82.61-88.67>[1.8] +19p13.3p13.1<0.64-19.72>[1.41] +20p12.3p13<0.27-9.14>[1.26] +21q22.1<33.30-37.23>[1.79] +21q22.1<37.24-38.54>[2.5] +21q22.1<38.54-39.38>[3.00] +21q22.2q22.3<39.40-43.22>[2.18] +21q22.3<43.23-46.89>[1.70] +22q13.1<35.86=37.20>[1.33]	-2pterp22.3<0.02-32.60>[0.66] -2p14p13.3<68.01-71.72>[0.66] -2q35qter<219.02-242.39>[0.66] -3p22p21.3<38.35-49.66>[0.66] -5q14.2q33.3<82.18-158.75>[0.61] -7p15.2p15.3<19.64-26.31>[0.63] -7q11.22q11.23<69.84-72.44>[0.65] -7q21.12q22.2<87.65-105.96>[0.71] -7q31.32q36.3<123.35-158.81>[0.64] -14q32.3<105.60-105-70>[0.74]* -15q26.2q26.3<94.55-100.21>[0.75] -16p13.3q23.1<15.38-78.80>[0.74] -17p11.2q12<0.18-29.54>[0.65] -17q21.3q21.33<38.29-46.94>[0.66]	46,XY,+1p34.2p36.3,-2pterp22.3,-2p14p13.3, 2q35qter,+ 3p21.3, -3p21.3p22.2,+4p16.3,-5q14.2q33.3,-7p15.2p15.3, 7q11.2, -7q21.1q22.2, -7q31.3q36.3,+15q11.2,+15q22.2q26.2, +15q23,-15q26.2q26.3,-16p13.3q23.1,+16q23.3q24.3, -17p11.2q12,-17q21.31q21.3, +19p13.3p13.1, +20p12.3p13, +21q22.1q22.3,+22q13.1
p-21	+3p14.3p14.2<57.97-62.19>[1.48] +3p14.2p14.1<63.60-64.29>[1.31] +3p14.1<64.32-65.50>[4.61] +3p14.1<66.40-67.67>[4.71] +3p11.2qter<89.28-199.32>[1.35] +21q11.2q21.1<14.29-17.97>[5.46] +21q22.1q22.3<38.27-43.54>[5.45] +21q22.3<43.59-45.12>[2.11] +21q22.3qter<45.12-46.91>[1.7]	-1q21.1q44<147.21-247.19>[0.62] -2p11.2<89.38-91.05>[0.61]* -2pterp24.3<0.02-16.22>[0.61] -3 p24.3p14.3<0.03-57.40>[0.63] -3p14.2<62.20-63.58>[0.60] -3p14.1<65.51-66.11>[0.60] -3p14.1p12.1<67.68-86.30>[0.67] -4q22.1q27<88.94-123.72>[0.61] -9q22.3q31.1<93.92-103.86>[0.63]	50-53,XY,-1 q21.1q44,-2p24.3, -3p12.1p14.1,+3p14.1, 3p14.1,+3p14.1p14.2,+3p14.2p14.3, -3p14.3p24.3,+3p11.2qter, -4q22.1q27,-9q22.3q31.1, +21q11.2q21.1, +21q22.1qter
p-22	-4q28.2q28.3<130,24-134,36>[0,55] -12p12.1p13.2<11,40-21,20>[0,55] -18q21.2<48,99-51,05>[0,55] -18q22.3q23<69,56-76,03>[0,55]	46,XY,t(3;5)(q25;q34), del(4)(q28.2q28.3),der(12)t(4;12; 18)(q28?;p12;q21), -12p12.1p13.2,-18q21.2,-18q22.3q23	

Tableau 13 - Suite

P	GAINS	PERTES	CARYOTYPE RÉVISÉ
p-23	+1q23.2qter<158.48-247.17>[1.24]	Pas de CNA	46,XY,t(11;12)(q13;p13)/ 46,XY,id,der(1)t(1;1)(p16;q12)/46,XY,id,der(7)t(1;7)(q12;q36)/ 46,XY,id,der(9)t(1;9)(q12;p24) /46,XY,id,der(14)t(1;14)(q12;p10) 46,XY,id,der(20)t(1;20)(q12;p12)/ 46,XY,id,der(20)t(1;20)(q12;q13)/ 46,XY,id,der(21)t(1;21)(q12;q10),+1q23.2qter
p-5	+4pterqter<0.06-191.02>[1.43]	Pas de CNA	47,XY,t(2;14)(q21;q32),+4
p-32		-3p21.3p21.3<44,20-49,02>[0,59]	46,XY,-3p21.3
p-6	+1q32.1qter<201.31-247.10>[1.39]		46,XX,der(5)t(1;5)(q32;q35),inv(9)(p12q13)
p-1		-7<0.14-158.76>[0.61]	45,XX,-7
p-2	+Xp22.2<15.95-16.61>[2.04]	-7<0.14-158.76>[0.55] -22q11.2<21.36-21.41>[0.52]	45,XY,+Xp22.2,-7,-22q11.2
p-7	+11q24.2qter<124.85-134.43>[1.23]	-7q31.2qter<115.49-158.78>[0.77]	46,XY,-7q31.2q36.3,+11q24.2q25
p-3	+8pterqter<0.16-146.25>[1.27] +13pterqter<18.31-114.12>[1.28]	-2p11.2<88.93-89.14>[0.69]*	48,XY,+8,+13
p-18	Pas de CNA	-8q21.3q22.1<93.15-94.17>[0.63] -9q12q31.1<67.20-104.45>[0.62]	46,XY,t(8;21)(q22;q22),del(8)(q21.3q22.1),-9q12q31.1
p-13	+17q21.2<35.76-35.84>[1.49]	Pas de CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21),+17q21.2
p-4	+21q11.2qter<14.31-46.91>[1.77]	Pas de CNA	47,XX,+i(21q)
p-8	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX,t(15;17)(q22;q21)
p-9	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX,t(15;17)(q22;q21)
p-10	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21)
p-11	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21)
p-12	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21)
p-14	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21)
p-15	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY,t(15;17)(q22;q21)

Tableau 13 - Suite

P	GAINS	PERTES	CARYOTYPES REVISES
p-16	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY,t(16;16)(p13;q22)
p-17	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY,t(16;16)(p13;q22)
p-19	Pas de CNA	-14q32.3<105.02-105.04>[0.76]*	45,t(9;11)(p22;q23),del(7)(p12;p21)
p-20	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY, t(9;11)(p22;q23)
p-25	Pas de CNA	-14q32.3<105.96-105.94>[0.61]*	46,XX
p-26	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX
p-27	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX
p-28	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX
p-29	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX
p-30	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX
p-31	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY
p-33	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY
p-34	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY
p-35	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY
p-36	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY

Les valeurs entre crochets correspondent aux log ratios linéaires des CNA ou de leur moyenne lorsque l'ensemble du CNA est étendu sur plusieurs oligonucléotides.

Tableau 14 - Gains et pertes de CNA des p-LAM et leur caryotype révisé après aCGH 2x400K

P	GAINS	PERTES	CARYOTYPES RÉVISÉS
p-joy	10q11.2<46.41-47.07>, Xp22.3<2.71-6.16>, Xp22.3<6.17-6.94> Xq13.1<68.77-68.78>	4q22.1<93.85-94.20>, 7q11.21<64.35-64.85>, 8p23.2<2.28-2.30>, 11q25<13.36-13.37>, 12p13.2<11.14-11.17>, 12p13.2<11.17-11.50>, 13q12.1<24.85-24.94>, 14q32.3<105.67-106.04>, 22q13.1<37.69-37.70>	46. XY, -4q22.1<93.85-94.20>, -7q11.21<64.35-64.85>,-8p23.2<2.28-2.30>,+10q11.2<46.41-47.07>, -11q25<13.36-13.37>,-12p13.2<11.14-11.17>,-12p13.2<11.17-11.50>, -13q12.1<24.85-24.94>,-14q32.3<105.67-106.04>,-22q13.1<37.69-37.70>, +Xp22.3<2.71-6.16>+Xp22.3<6.17-6.94>,+Xq13.1<68.77-68.78>
p-out	Pas de CNA	2q31.2<180.14-185.15>, 3q26.1<164.10-164.15>, 3q29<194.38-194.44>, 3q29<196.92-196.99>, 8q11.2<51.22-51.23>, 21q22.1<35.10-35.15>, Xq23<113.84-113.84>	46.XY,- 2q31.2<180.14-185.15>,-3q26.1<164.10-164.15>,-3q29<194.38-194.44>,-3q29<196.92-196.99>,-8q11.2<51.22-51.23>,-21q22.1<35.10-35.15>,-Xq23<113.84-113.84>
p-bar	3q12.2<101.85-101.95>, 7q35<143.71-143.73>, 20q13.3<60.03-60.06>, 22q13.3<45.92-45.98>	1q31.3<195.10-195.12>, 2p16.3<52.66-52.68>, 5q35.3<180.37-180.37>, 9p11.2<43.77-67.90>, 10q23.1<84.06-84.07>, 14q21.1<40.80-40.83>	46.XX,-1q31.3<195.10-195.12>,-2p16.3<52.66-52.68>,+3q12.2<101.85-101.95>,-5q35.3<180.37-180.37>,+7q35<143.71-143.73>,-9p11.2<43.77-67.90>,-10q23.1<84.06-84.07>,-14q21.1<40.80-40.83>,+20q13.3<60.03-60.06>,+22q13.3<45.92-45.98>
p-dou	5p15.2<9.70-9.81>, 5p15.2<10.47-10.68>, 8q24.3<145.07-145.12>, 14q11.2<21.52-22.08>, 17q25.3<76.92-76.98>, Xq22.2<16.56-16.88>	1p33<49.69-49.76>, 16p11.2<34.06-34.39>, 17p13.1<11.16-11.18>, 18p11.3<1.72-1.83>, Xq22.3<103.61-103.65>	46.XY,-1p33<49.69-49.76>,+5p15.2<9.70-9.81>,+5p15.2<10.47-10.68>,+8q24.3<145.07-145.12>,+14q11.2<21.52-22.08>,-17p13.1<11.16-11.18>,+17q25.3<76.92-76.98>,-18p11.3<1.72-1.83>,+ Xq22.2<16.56-16.88>,+ Xq22.3<103.61-103.65>
p-vio	Pas de CNA	1p21.1<1.02-1.03>, 15q11.2<19.91-20.38>, 15q26.1<88.44-88.46>	46.XX,-1p21.1<1.02-1.03>,-15q11.2<19.91-20.38>,-15q26.1<88.44-88.46>
p-lah	4p16.2<3.40-3.57>, 5p15.3<0.90-0.94>	5q13.2<70.76-70.80>	46.XX,+ 4p16.2<3.40-3.57>,+5p15.3<0.90-0.94>,-5q13.2<70.76-70.80>
p-gia	7p22.1<6.20-6.21>, 8p11.2q24.3<39,55-146,26> 20p13<3.17-3.18>	20p12.1<14.71-14.74>	46.XX,+7p22.1<6.20-6.21>,+8p11.2q24.3<39,55-146,26>* +20p13<3.17-3.18>,-20p12.1<14.71-14.74>

Tableau 14 - Suite

P	GAINS	PERTES	CARYOTYPES RÉVISÉS
p-gui	9q32<114.46-114.66>, Xq28<152.91-152.99>	14q11.2<20.47-20.51>,	46,XX,+9q32<114.46-114.66>, -14q11.2<20.47-20.51>,+Xq28<152.91-152.99>
p-hei	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XX
p-hen	Pas de CNA	12p13.2<11.96-12.07>, 12q22<92.37-94.33>, 15q21.3q22.1<52.06-56.09>, 20p13<1.51-1.53>, 21q22.1<35.04-36.82>	46,XX,-12p13.2<11.96-12.07>,-12q22<92.37-94.33>,- 15q21.3q22.1<52.06-56.09>,-20p13<1.51-1.53>,- -21q22.1<35.04-36.82>
p-abr	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY
p-brt	Pas de CNA	7q31.3q36.2<122.84-153.49>, 8q24.2<126.59-130.55>, 12p13.3<7.93-8.05>, 20q13.3<59.45-59.52>	46,XY,- 7q31.3q36.2<122.84-153.49>,-8q24.2<126.59-130.55>,- -20q13.3<59.45-59.52>
p-bia	Pas de CNA	Pas de CNA	46,XY

Tableau issu de l'article de Wong *et al*– Quelques exemples de CNV associés aux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur et cancers.

Chromosome Band	Gains and Losses ^a	Gene(s) ^b	Product ^c	Clone(s) in Locus ^d
1p36.33	49	<i>SKI</i>	V-ski sarcoma viral oncogene homolog	RP11-83K22, RP11-181G12
1p36.32	12	<i>TP73</i>	Tumor protein p73	RP11-631K6
1p36.31	16	<i>TNFRSF25</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily,	RP11-58A11
1p32.3	32	<i>RAB3B</i>	RAB3B, member RAS oncogene family	RP11-469M21, RP11-91A18
1p13.3	6	<i>VAV3</i>	Vav 3 oncogene	RP11-480L11
2q14.2	18	<i>RALB</i>	V-val simian leukemia viral oncogene homolog B	RP11-818M2
2q37.3	6	<i>BOK</i>	BCL2-related ovarian killer	RP11-343P10
3p21.31	20	<i>NAT6, TUSC2, TUSC4</i>	Putative tumor suppressor FUS2, tumor suppressor candidates 2 & 4	RP11-787014, RP13-487A19
4q31.1	3	<i>RAB33B</i>	RAB33B, member RAS oncogene family	RP11-124P22
6q21	3	<i>C6orf210</i>	Candidate tumor suppressor protein	RP11-601012
6q25.1	20	<i>ESR1</i>	Estrogen receptor 1	RP11-655H19
7p22.3	19	<i>MAFK</i>	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene	RP11-16P10
7p22.3	6	<i>MAD1L1</i>	MAD1-like 1	RP11-32509
8q24.21	4	<i>MYC</i>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	CTD-2034C18
9q34.2	22	<i>VAV2</i>	Vav 2 oncogene	RP11-352K12, RP11-651E2
10p11.23	11	<i>MAP3K8</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase	RP11-350D11
11p15.4	15	<i>CDKN1C</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	RP11-494F4
11p13	3	<i>WT1, WIT-1</i>	Wilms tumor 1 isoform A/B/C/D, Wilms tumor associated protein	RP11-710L2
11p11.2	3	<i>C1QTNF4</i>	C1q and tumor necrosis factor related protein 4	RP11-425G10
11q13.1	3	<i>MEN1</i>	Menin isoform 1	RP11-48509
11q13.3	6	<i>CCND1, ORAOV1</i>	Cyclin D1, oral cancer overexpressed 1	RP11-124K14
12q13.12	4	<i>MLL2</i>	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	RP11-66M13
13q31.1	4	<i>C13orf10</i>	Cutaneous T-cell lymphoma tumor antigen se70-2	RP11-86D5
14q32.32	3	<i>TNFAIP2</i>	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	RP11-455L5
16p13.3	19	<i>AXIN1</i>	Axin 1 isoform a/b	RP11-598I20
16q22.3	3	<i>BCAR1</i>	Breast cancer anti-estrogen resistance 1	RP11-109K6
17p13.2	6	<i>TAX1BP3</i>	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I)	RP11-753P16
17q11.2	6	<i>NF1</i>	Neurofibromin	RP11-518B17
17q21.32	3	<i>PHB</i>	Prohibitin	RP11-472H5
17q25.3	17	<i>MAFG</i>	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene	RP11-634L10, RP11-712H22
17q25.3	6	<i>C1QTNF1</i>	C1q and tumor necrosis factor related protein 1	RP11-167N2
18p11.32	15	<i>YES1</i>	Viral oncogene yes-1 homolog 1	RP11-806L2
18q21.1	8	<i>DCC</i>	Deleted in colorectal carcinoma	RP11-346H17
19p13.3	6	<i>SH3GL1</i>	SH3-domain GRB2-like 1	RP11-406I1
19p13.3	4	<i>TNFSF9, TNFSF7, TNFSF14</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, members	RP11-526C20
19p13.3	4	<i>VAV1</i>	Vav 1 oncogene	CTD-2200016
19p13.11	16	<i>RAB3A</i>	RAB3A, member RAS oncogene family	RP11-512B16
19q13.33	15	<i>PTOV1</i>	Prostate tumor overexpressed gene 1	RP11-597G9
19q13.33	7	<i>BAX</i>	BCL2-associated X protein isoform sigma/gamma/epsilon/delta/beta/alpha	CTD-2017J20
19q13.33	8	<i>RRAS</i>	Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	RP11-264M8, RP11-808J4
20q13.13	3	<i>BCAS4</i>	Breast carcinoma amplified sequence 4 isoform a/b	RP11-124P7
22q11.21	3	<i>HIC2</i>	Hypermethylated in cancer 2	CTD-2245I11

^a Nombre total de copy number en gains et pertes dans un locus de CNV

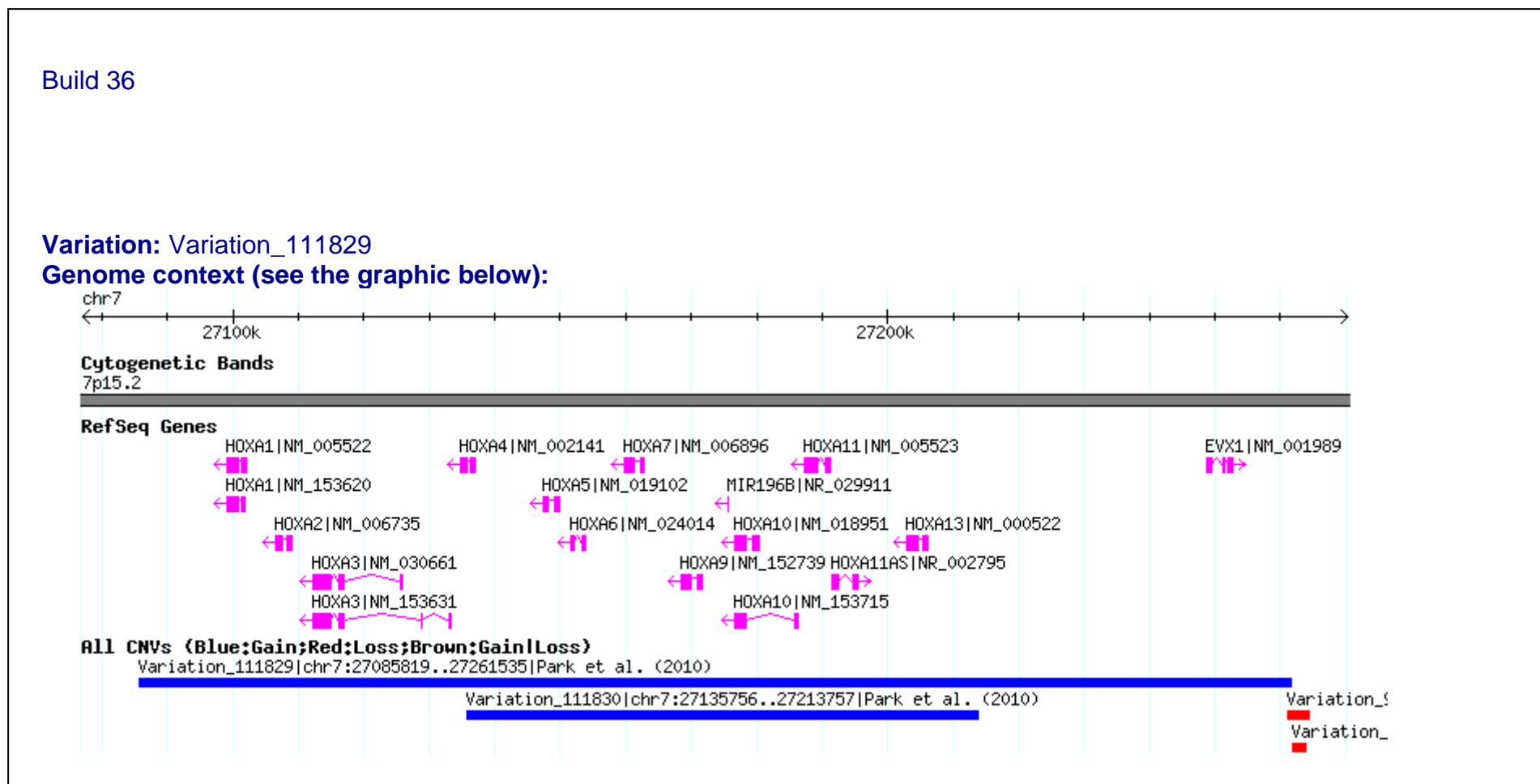
^b Gène associé à un cancer selon la RefSeq de l'UCSC et l'OMIM Morbid Map couvrant un locus de CNV

^c Protéine codée par le gène

^d Clone ou clone couvrant un locus de CNV

Wong KK *et al*, *J Clin Oncol*, 2007

Figure 7 – Variation_111829 contenant les gènes de la famille HOXA.



[http:// projects.tcag](http://projects.tcag)

PUBLICATIONS PERSONNELLES

Itzhar N, Dessen P, Toujani S, Auger N, Preudhomme C, Richon C, Lazar V, Saada V, Bennaceur A, Bourhis JH, de Botton S, Bernheim A. Chromosomal minimal critical regions in therapy-related leukemia appear different from those of de novo leukemia by high-resolution aCGH. *PLoS One*. 2011 Feb 14;6(2):e16623.

Toujani S, Dessen P, **Itzhar N**, *et al.* High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *PloS One*, 2009, 4(9):e7089.

Berceanu A, Toujani S, Da Costa L, **Itzhar N**, Lapusan S, Bernheim A, Ribrag V. An unusual case of a lymphoblastic lymphoma with initial bilateral breast lesions but with c-myc and bcl-2 rearrangements. *Leuk Lymphoma*. 2007 48(2):415-417.

Poster SFH 2011