HAL
open science

REMANIEMENTS DU GENE NUP98 DANS LES HEMOPATHIES MALIGNES HUMAINES

Arnaud Petit

To cite this version:

Arnaud Petit. REMANIEMENTS DU GENE NUP98 DANS LES HEMOPATHIES MALIGNES HUMAINES. Cancer. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2010. Français. NNT : 2010PA077086 . tel-00649445

HAL Id: tel-00649445

https://theses.hal.science/tel-00649445v1

Submitted on 8 Dec 2011

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.

Université Paris.Diderot – Paris 7
Ecole doctorale B3MI
Biochimie, Biothérapies, Biologie moléculaire et infectiologie

THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS.DIDEROT

SPECIALITE : GENETIQUE

Présentée et soutenue publiquement le 09/09/2010 par

Arnaud PETIT

REMANIEMENTS DU GENE *NUP98*

DANS LES HEMOPATHIES MALIGNES HUMAINES

Directeur de thèse: Pr Serge ROMANA

Membres du Jury

Pr André BARUCHEL	Président
Dr Alain BERNHEIM	Rapporteur
Pr Judith LANDMAN-PARKER	Rapporteur
Dr Nicole DASTUGUE	Examinateur
Pr Michel VEKEMANS	Examinateur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont entouré et accompagné dans la réalisation, l'écriture et l'expertise de cette thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier Judith Landman-Parker et Guy Leverger, pour m'avoir encouragé à entreprendre un travail de recherche sur la leucémogénèse et soutenu dans l'écriture de cette thèse durant mon clinicat.

Je remercie Olivier Bernard de m'avoir accepté dans son laboratoire, conseillé et accompagné, notamment dans l'élaboration des PCR et des différents clonages.

Merci à Serge Romana d'avoir accepté de m'encadrer pour la réalisation du master, puis de ma thèse, et de m'avoir permis de participer à ce travail collaboratif sur l'étude des fusions *NUP98* dans les hémopathies malignes humaines.

Merci à Xinying Su qui a assuré la lourde tâche de m'accueillir et de m'encadrer pour mes premiers travaux nécessitant l'utilisation des techniques de PCR.

Merci à Christine Ragu qui m'a secondé et accompagné dans l'apprentissage de la cytométrie en flux et dans l'approche expérimentale animale, malgré son lourd travail de thèse.

Merci à Véronique Della-Valle pour son aide dans l'apprentissage de la culture cellulaire, du clonage, du western blot et du southern blot. Merci pour ta bonne humeur et ton éternelle jeunesse.

Merci au Pr Vekemans et son équipe (Isabelle Radford, Nathalie, Fabienne, Marie-Christine et Marc), pour m'avoir accueilli dans le service de cytogénétique afin d'y apprendre les techniques du caryotype standard et de la FISH. Je vous remercie également pour l'aide matérielle que vous m'avez accordée dans l'attente de ma bourse de thèse.

Merci à Maryvonne Busson-Le Coniat pour son aide dans l'apprentissage et l'analyse de la FISH.

Merci à Eric Delabesse pour son aide dans l'étude de la fréquence des fusions NUP98-HMGB3, NUP98-CCDC28A et l'étude de l'expression de HMGB3 et CCDC28A dans les échantillons tumoraux humains.

Merci à Véronique Pénard-Lacronique pour son aide dans l'élaboration des expérimentations animales, dans les techniques de culture cellulaire, du western blot, de marquage radioactif, dans l'analyse des résultats et dans l'aide à l'écriture du manuscrit *NUP98-CCDC28A* à venir.

Merci à Roland Berger pour son soutien, ses conseils, son écoute et son aide tout au long de cette thèse, en particulier pour sa généreuse contribution dans le travail sur la fusion *NUP98- NSD1*.

Merci à Julie Bergeron pour son aide dans l'apprentissage de la cytologie hématologique murine et pour son interprétation des frottis sanguins et médullaires lors des expérimentations animales.

Merci à Frédéric Baleydier pour son aide dans l'apprentissage du Southern Blot ainsi que son soutien « confraternel » et amical durant ces années communes de laboratoire.

Merci à mes camarades de paillasse et de bureau, Christine, Dominique, Elise, Julie, Véro, Xing, Waji, Sébastien, et Frédéric, avec lesquels j'ai partagé des moments très agréables en journées ou en soirées. Merci également à Martine et Corinne.

Ce travail de thèse a mobilisé de nombreuses autres personnes, des laboratoires d'hématologie du Pr Elizabeth Macintyre, d'anatomie pathologique du Pr Nicole Brousse, de cytogénétique du Pr Vekemans, de génétique du Pr Munich, des plateformes techniques de l'IRNEM qui, directement ou indirectement, m'ont aidé dans la réalisation de cette thèse. Je les remercie pour le temps qu'ils m'ont accordé.

Merci aux cliniciens, qui ont alimenté ce travail, et aux patients, qui acceptent de fournir leurs échantillons biologiques et permettent ainsi la réalisation de telles recherches, dans l'espoir d'identifier de nouvelles thérapeutiques plus efficaces.

L'écriture, la lecture et l'expertise de cette thèse ont également mobilisé le temps de mon directeur de thèse et des membres du jury.

Merci à Serge Romana pour ses conseils dans la rédaction de ce manuscrit et son aide dans le travail de correction.

Merci à Judith Landman-Parker et Alain Bernheim, pour avoir jugé ce travail et avoir si rapidement rendu leur rapport de thèse.

Merci à André Baruchel pour avoir accepté de présider cette thèse.

Merci à Nicole Dastugue et Michel Vekemans d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes collègues du service d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique de l'hôpital Trousseau ont également contribué à ce travail en me libérant le temps nécessaire à l'écriture. Je remercie Anne Auvrignon, Catherine Dollfus, Jean Donadieu, Sylvie Fasola, Perle Pagès, Marie-Dominique Tabone, mon chef de service Guy Leverger, et son bras droit Judith Landman-Parker.

Ce travail a été possible grâce aux financeurs : La ligue et l'ARC. Je remercie les généreux donateurs de ces associations. Je remercie également Marc Estève et Jean Michon qui m'ont permis d'assurer des gardes à l'Institut Curie pendant cette thèse.

Merci à mes parents, mon frère, ma sœur, ma grande famille, mes proches et amis, qui m'ont soutenu depuis toujours, notamment depuis mon entrée à l'université, en 1991 ...

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS 8
FIGURES ET TABLEAUX 11
I. AVANT-PROPOS 13
II. INTRODUCTION 15
A. L'hématopoïèse 15
1. Généralités 15
2. Cellules souches hématopoïétiques 17
3. Programme génétique de la différenciation hématopoïétique 18
a) Généralités 18
b) Gènes *HOX* et hématopoïèse 20
B. Les leucémies aigües 25
1. Historique 25
2. Classification des hémopathies malignes humaines 26
3. Épidémiologie 27
4. Cellules souches leucémiques 28
C. Anomalies génétiques dans les hémopathies malignes. 31
1. De la cytogénétique à la biologie moléculaire 31
2. Anomalies chromosomiques 32
a) Anomalies de structure et recombinaisons géniques 32
b) Déséquilibres génomiques 34
3. Les mutations géniques 35
4. Coopération oncogénique 38
5. Gènes à multipartenaires 40
D. Le gène *NUP98* 47
1. Le complexe de pore nucléaire 47
a) Rappels 47
b) Le CPN en pathologie humaine 48
c) NUP98 dans le CPN 49
2. *NUP98* dans les hémopathies malignes 51
III. RÉSULTATS 53
A. Article 1 54

B. Article 2 67
C. Article 3 72
D. Etude de la fusion *NUP98-CCDC28A* 77
1. INTRODUCTION 77
2. MATERIEL ET METHODES 77
a) Cas clinique 77
b) Caractérisation moléculaire de la fusion 77
c) PCR 79
d) Construction des vecteurs 82
e) Analyse de la protéine CCDC28A par transfection transitoire 83
f) Transplantation de moelle osseuse et analyse des animaux 84
g) Tests clonogéniques 85
h) Marquages cellulaires et analyse de cytométrie en flux 85
i) Northern blot 85
j) Analyse de séquences 85
3. RESULTATS 86
a) Le gène *NUP98* est fusionné au gène *CCDC28A* par la t(6;11)(q24.1;p15.4) 86
b) Expression de CCDC28A par Northern Blot 89
c) Protéine CCDC28A 89
d) Etude de la fusion *NUP98 -CCDC28A* 91
D. Résultats complémentaires 102
1. Expression des gènes *CCDC28A* et *HMGB3* chez l'embryon humain. 102
2. Etude de la fréquence des remaniements NUP98-CCDC28A et NUP98-HMGB3 dans les hémopathies malignes humaines. 102
3. Etude de l'expression de CCDC28A et HMGB3 dans les hémopathies malignes humaines. 103
4. Etude de la ploïdie chez les souris NUP98-CCDC28A 105
IV. DISCUSSION 106
A. *NUP98* est remanié avec 28 gènes partenaires 106
B. *NUP98* dans les hémopathies malignes humaines 116
1. Aspects épidémiologiques et cliniques. 116
2. Aspects cytogénétiques 119
3. Aspects moléculaires 120
4. Pronostic des hémopathies malignes impliquant *NUP98* 121

C. Aspects fonctionnels des fusions *NUP98* 122
1. Que nous apprennent les modèles murins à propos des fusions *NUP98* ? 122
2. Étude fonctionnelle de la fusion *NUP98-HMGB3* 124
3. Étude de la fusion *NUP98-CCDC28A* 126
E. Conclusion 128
F. Perspectives 130
V. REFERENCES 131

ABREVIATIONS

AA	Acide aminé
ABL	Abelson
ADN	Acide desoxyribo-nucléique
ANGPT1	Angiopoietin-1
ANKRD28	Ankyrin repeat domain 28
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome
ARID5B	AT-rich interactive domain 5B
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
BBS	Bardet-Biedl Syndrome
BCR	Breakpoint Cluster Region
BFUE	Erythroid Burst-Forming Unit
BPTF	Bromodomaine PHD Transcription Factor
C/EBP	CAAT/Enhancer Binding Proteins
C/EBPA	CAAT/Enhancer Binding Protein A
CCDC6	Coiled-Coil Domain-Containing protein 6
CDKI	Cyclin-Dependant Kinase Inhibitors
CDX2	Caudal-type homeobox transcription factor 2
CEBPE	CAAT/Enhancer Binding Protein Epsilon
CFU-GM	Granulocyte/Macrophage Colony-Forming Unit
ChIP-chip	Chromatin immunoprecipitation coupled with genomic tiling microarrays
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
CPB	CREB-Binding Protein
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPN	Complexe de pore nucléaire
CSH (ou HSC)	Cellules Souches Hématopoïétiques (Hematopoietic Stem Cell)
CSL	Cellules souches leucémiques
DC	Dendritic Cell
DNMT	DNA MethylTransferase1
DOT1L	Histone H3 methyl transferase DOT1-like
EEN	Extra Eleven-Nineteen leukemia fusion gene
ENL	Eleven-Nineteen leukemia fusion gene
EP	Erythrocyte Progenitor
EPS15	Epidermal growth factor receptor Pathway Substrate 15
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ets	E-26 transforming specific
ETV6	ETs Variant gene 6
EVI1	Ecotropical Virus Insertion site 1
FISH	Fluorescent in situ hybridization
FLT3	FMS-related tyrosine kinase 3
GAS7	Growth Arrest-Specific 7
GEF	Guanine nucleotide exchange factor

GFCH	Groupe Français de Cytogénétique Hématologique
GFI1	Growth-Factor Independant 1
GFP	Green fluorescent protein
GMP	Granulocyte-Macrophage Progenitors
GP	Granulocyte Progenitor
H3K4	Histone 3 Lysine 4
H3K79	Histone 3 Lysine 79
H4R3	Histone 4 Arginine 3
HD	HomeoDomain
HDACs	Histones DésACétylases
HHEX	Hematopoietically expressed homeobox
HLXB9	Homeobox gene HB9
HMGB	High mobility group box
HMT	Histone Méthyl Transférase
HOX	Homeobox
IKZF1	Ikaros family zing finger 1
IQCG	IQ motif containing protein G
IRF8	Interferon-Regulatory Factor 8
ITD	Internal Tandem Duplication
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KI	Knock In
KO	Knock Out
LAL	Leucémie aigue lymphoblastique
LAM	Leucémie aigue myéloblastique
LEDGF	Lens Epithelium-Derived Growth Factor
Lin	Lineage markers
LINEs	Long Interspersed Nuclear Elements
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LT-HSC	Long Term Hematopoietic Stem Cell
MacP	Macrophage Progenitor
MAP	Mitogene-Activated protein
Mb	Mégabase
MEIS	Myeloid ecotrophic insertion site 1
MEN1	MeNingioma gene 1 (MN1/TEL fusion gene)
MEP	Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor
MkP	Megakaryocyte Progenitor
Mks	Megakaryocytes
MLL	Mixed-lineage leukemia
MPD	MyeloProliferative Disorder
MPP	Progéniteurs multipotents (MultiPotent Progenitors)
MPs	Myeloid Progenitors
MYC	V-MYC avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NARs	Nucleoporin Associated Regions
NES	Nuclear exportation signal
NK	Natural Killer

NLS	Nuclear localisation signal
NPM1	Nucleophosmin family member 1
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NTR	Nuclear transport receptor
NUP98	Nucleoporin 98
PAX5	PAired boX gene 5
PBX	Pre-B cell leukemia transcription factor
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFRβ	Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Beta
PHD	Plant HomeoDomain
PHF23	Plant Homeodomain finger 23
PI-3	PhosphatidylInositol 3
PML	Inducer of acute promyelocytic leukemia
PRMT1	PRotein arginine Methyl Transferase 1
RAE1	RNA export 1, S. Pombe, homolog of
RARA	Retinoic Acid Receptor Alpha
REN	Renin
RET	Rearranged during Transfection Protooncogene
RHD	Runt Homology Domain
RT-PCR	Reverse transcriptase – Polymerase chain reaction
RUNX1	RUNt-related transcription factor 1
SAM	Sterile Alpha Motif
SCL	Stem-Cell Leukemia factor
SMD	Syndrome myélodysplasique
SET	Suppressor variegation-Enhancer of zeste-Trithorax
SmgGDS	Small G-protein dissociation stimulator
ST-HSC	Short Term Hematopoietic Stem Cell
TALE	Three-Amino-acid-Loop-Extension
TAP	Tip associated protein
TPR	Translocated promotor region

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1	Différenciation hématopoïétique chez la souris et l'homme	p. 16
Figure 2	Activation séquentielle des facteurs de transcription dans la différenciation myéloïde	p. 19
Figure 3	Organisation du cluster des gènes *HOX*	p. 22
Figure 4	Représentation de la coopération génétique impliquée dans la leucémogenèse	p. 39
Figure 5	(A) Structure de la protéine (B) Mécanismes de transactivation des gènes cibles par les fusions *MLL*	p. 42
Figure 6	Nup98	p. 50
Figure 7	Principes de la PCR inverse	p. 81
Figure 8	Carte de restriction partielle *NUP98* et analyse par Southern Blot de l'ADN du patient	p. 87
Figure 9	PCR et analyse des séquences *NUP98-CCDC28A* et *CCDC28A-NUP98*	p. 88
Figure 10	FISH confirmant la fusion *NUP98-CCDC28A*	p. 90
Figure 11	Northern Blot : profil d'expression CCDC28A dans les tissus humains adultes	p. 90
Figure 12	Représentations schématiques de la protéine native NUP98 et de la protéine de fusion NUP98-CCDC28A.	p. 92
Figure 13	Localisation subcellulaire de la protéine CCDC28A-HA	p. 92
Figure 14	Courbe de survie de Kaplan Meier des souris greffées en receveurs primaires et secondaires.	p. 93
Figure 15	Analyse des tissus murins par Southern Blot	p. 94
Figure 16	Etudes cytologiques des frottis sanguins et médullaires (coloration MGG)	p. 95
Figure 17	Analyses histologiques d'une souris primaire NUP98-CCDC28A	p. 95
Figure 18	Tests clonogéniques en méthylcellulose	p. 97
Figure 19	Analyse des marqueurs de surface par cytométrie en flux	p. 98
Figure 20	Analyse par cytométrie de flux des progéniteurs hématopoiétiques	p. 100
Figure 21	Expression des HOX et cofacteurs chez les souris greffées	p. 100

Figure 22	Expression de CCDC28A et HMGB3 dans des échantillons humains de leucémie aigüe	p. 104
Figure 23	Caryotype de la lignée immortalisée NUP98-CCDC28A	p. 105
Figure 24	Localisations des points de cassure sur le gène NUP98. Classification des 28 gènes partenaires.	p. 109
Figure 25	Structures des principales fusions *NUP98-partenaires*.	p. 110
Figure 26	Répartition des gènes partenaires de *NUP98* dans les hémopathies malignes humaines.	p. 109
Figure 27	Phénotype des hémopathies malignes associées aux fusions *NUP98*	p. 118
Figure 28	Corrélation phénotype – génotype dans les fusions *NUP98*	p. 119
Tableau 1	Phénotypes des souris invalidés pour des facteurs de transcription spécifiques de lignée impliqués dans la maturation myéloïde	p. 20
Tableau 2	Principales anomalies structurales cytogénétiques récurrentes dans les hémopathies malignes	p. 33
Tableau 3	Séquences des amorces utilisées	p. 80
Tableau 4	Résultats sanguins des hémogrammes pratiqués chez les souris greffées	p. 94
Tableau 5	Expression des gènes *CCDC28A* et *HMGB3* dans les tissus embryonnaires humains	p. 102
Tableau 6	Caractéristiques cliniques et cytogénétiques des 33 patients avec réarrangements *NUP98* publiés depuis 2006	p. 107 – 108
Tableau 7	Caractéristiques des 128 patients publiés, atteints d'hémopathies malignes, avec remaniements *NUP98*.	p. 117

I. AVANT-PROPOS

Les hémopathies malignes humaines, qui sont des proliférations cancéreuses touchant les adultes et les enfants, sont des maladies graves, dont l'issu, jusqu'au milieu du 20e siècle, conduisait inévitablement à la mort. Ce 20e siècle a vu l'amélioration spectaculaire du pronostic effroyable de ces maladies, avec l'allongement de la survie des patients et l'obtention de guérisons. Ces progrès sont le fruit d'un travail colossal de nos ainés médecins et scientifiques. La première tâche, avant l'ère de la guérison, a été de mener une approche nosologique rigoureuse, permettant une description clinique et biologique des maladies hématologiques. Le développement et la disponibilité d'agents pharmacologiques anticancéreux ont permis au travers des études de recherches cliniques, l'apprentissage des polychimiothérapies. La recherche scientifique s'est parallèlement développée, permettant une meilleure connaissance de la biologie du vivant et offrant des outils de caractérisation complémentaires, en particulier cytogénétique, moléculaire et immunologique. Ces outils ont permis d'identifier plus précisément ces maladies, d'élaborer des stratégies de traitement, intégrant des critères de gravité, et de formuler des hypothèses sur les mécanismes de cancérogénèse, dans le but d'identifier des thérapeutiques nouvelles.

Le fruit de cette recherche collaborative, unissant les connaissances médicales et scientifiques, a conduit à un enrichissement minutieux, rigoureux, pas-à-pas, d'une meilleure connaissance de la vie cellulaire et des pathologies humaines. L'un des exemples les plus parlants en hématologie maligne est celui de la leucémie myéloïde chronique (voir pour revue (Clarkson et al., 2003)). Sa première description clinique remonte à 1845. Le chromosome « Philadelphie » est décrit en 1960. Dix années plus tard, on identifie qu'il s'agit d'un chromosome 22 remanié, puis secondairement, est décrite la translocation réciproque t(9 ;22). La caractérisation moléculaire de cette translocation a identifié une fusion entre les gènes *BCR* et *ABL*, exprimant un transcrit de fusion, codant pour une protéine chimérique, à activité tyrosine kinase constitutive. L'activation de cette tyrosine kinase va déréguler différentes cibles cellulaires associées à la prolifération et la survie, induisant les manifestations cliniques et biologiques de la maladie. La mise au point d'un inhibiteur spécifique de cette protéine de fusion, l'imatinib a révolutionné le pronostic de cette maladie et l'approche thérapeutique des hémopathies malignes.

Le but de ce travail collaboratif de recherche, au sein de l'unité INSERM EMI0210, est de participer, au travers de l'étude d'anomalies cytogénétiques récurrentes dans les

hémopathies malignes, à l'identification de mécanismes clés de la transformation leucémique, permettant un jour, par des thérapeutiques ciblées, comme l'imatinib dans la LMC, d'améliorer le pronostic des formes graves ou réfractaires d'hémopathies malignes.

Après un rappel de l'hématopoïèse physiologique, une description des hémopathies malignes humaines et des mécanismes oncogénétiques de transformation leucémique, seront présentés les résultats de mon travail de thèse, s'intéressant aux remaniements d'un gène à multipartenaires, le gène *NUP98*, impliqués de manière récurrente dans les hémopathies malignes humaines.

II. INTRODUCTION

A. L'hématopoïèse

1. Généralités

L'hématopoïèse est le processus physiologique de différenciation cellulaire, conduisant à la production des différents éléments matures du sang circulant, indispensables à la vie des organismes complexes multicellulaires. Son but est d'aboutir à la production de cellules hautement spécialisées, aux fonctions diverses, afin de garantir les fonctions de respiration cellulaire par les globules rouges, de coagulation par les plaquettes et d'immunité par les leucocytes. L'hématopoïèse se met en place précocement dès la vie embryonnaire et doit assurer continuellement l'entretien et le renouvellement des différentes populations cellulaires tout au long de la vie de l'individu. Chez l'adulte, elle doit assurer le maintien d'un pool cellulaire d'environ 10^{12} cellules / jour. Cette impressionnante production de cellules, environ 4.10^{16} sur une vie, est possible grâce à la prolifération et à la différenciation des progéniteurs communs, issus eux-mêmes des cellules souches hématopoïétiques (Rufer et al., 1999).

Cette différenciation hématopoïétique est un processus régulé, pyramidal et hiérarchique de maturation des cellules sanguines. Le sommet est représenté par la cellule souche hématopoïétique (CSH), et la base est représentée par les cellules fonctionnelles matures. Les CSH possèdent la capacité d'autorenouvellement et de multipotence leur permettant de générer toutes les lignées du système hématopoïétique. Au cours de cette différenciation pyramidale, les CSH perdent d'abord leur capacité d'autorenouvellement, s'engagent vers des cellules multipotentes, les « multi-potent progenitors ou MPP », capables de donner des progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes, puis acquièrent leur potentiel de différenciation de lignée myéloïde ou lymphoïde, et finalement s'engagent, pour aboutir à la production des cellules fonctionnelles matures terminales. La ***Figure 1*** illustre ce processus de différenciation généralement admis, même si cette organisation est régulièrement remise en cause.

Ce processus de maturation hématopoïétique est contrôlé par des acteurs intracellulaires (activation/répression séquentielle de facteurs de transcription) et des acteurs

extracellulaires présents dans le microenvironnement médullaire (cytokines, molécules d'adhésion…).

Le phénotype et les propriétés des cellules du système hématopoïétique ont été étudiés chez la souris et chez l'homme, avec leurs particularités respectives d'espèce (Chao et al., 2008; Passegue et al., 2003). L'étude des marqueurs de surface, par cytométrie en flux, permet d'identifier ces différentes populations, accessibles au tri, et a permis d'établir leur profil transcriptionnel (***Figure 1***).

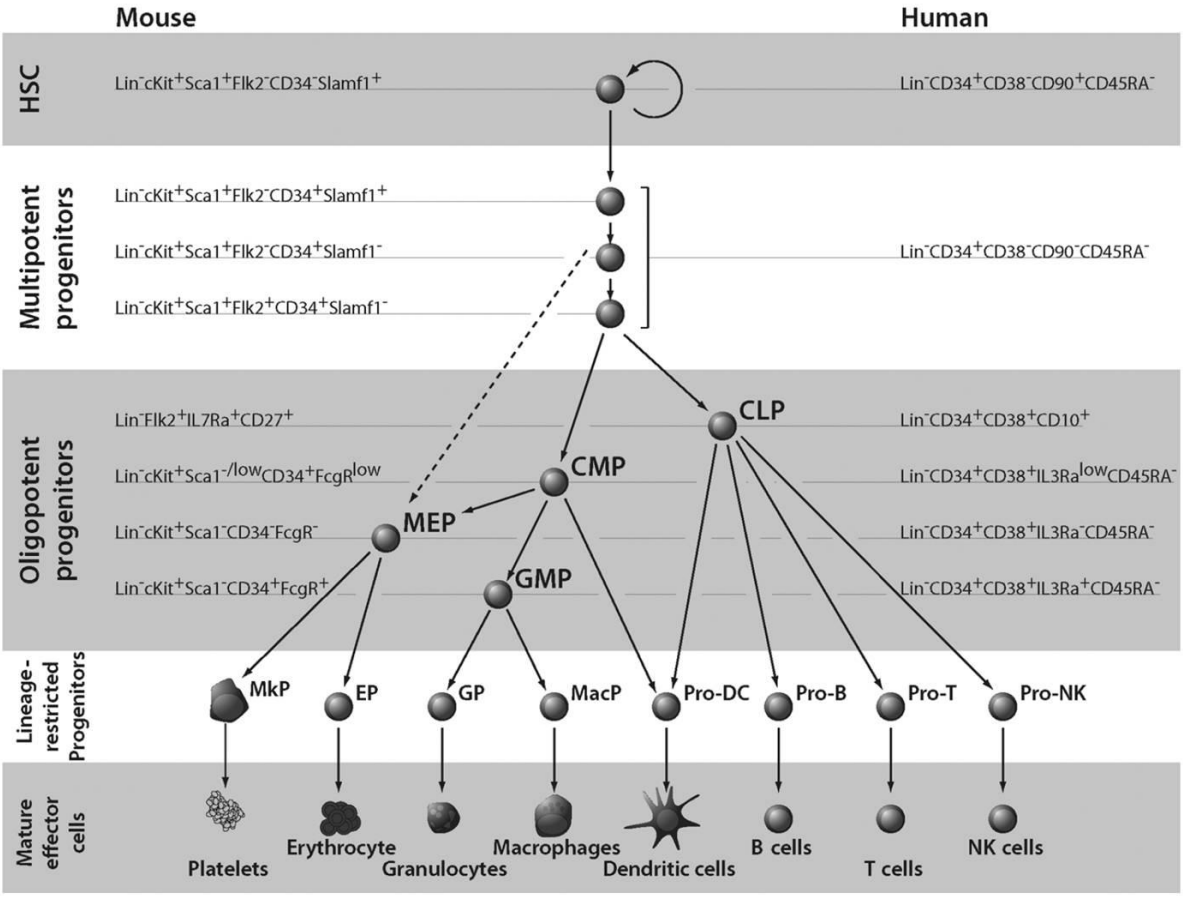


Figure 1: Différenciation hématopoïétique chez la souris et l'homme d'après (Chao et al., 2008) (HSC) hematopoietic stem cell; (CLP) common lymphoid progenitor; (CMP) common myeloid progenitor; (MEP) megakaryocyte-erythrocyte progenitor; (GMP) granulocyte-macrophage progenitors; (MkP) megakaryocyte progenitor; (EP) erythrocyte progenitor; (GP) granulocyte progenitor; (MacP) macrophage progenitor; (DC) dendritic cell; (NK) natural killer; (Lin) lineage markers.

2. Cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules multipotentes, capables d'autorenouvellement, de prolifération et différenciation. Elles sont rares et ont comme propriété principale, lorsqu'elles sont greffées dans des animaux irradiés, de reconstituer l'ensemble des lignées du système hématopoïétique. Leur définition obéit donc à des critères fonctionnels, mais aussi phénotypiques.

Ces cellules, qui apparaissent dès la vie embryonnaire, doivent persister et assurer la pérennité de l'hématopoïèse durant toute la vie. Les travaux expérimentaux d'étude des CSH, chez la souris irradiée, ont mis en évidence l'existence de deux sous populations : les Long Term-HSC (LT-HSC) et les Short Term-HSC (ST-HSC) qui diffèrent par leur capacité à reconstituer le système hématopoïétique à long (plus de 6 mois) ou à court terme. Ces deux fractions de CSH se distinguent des cellules différenciées par l'absence d'expression de marqueurs membranaires définissant l'engagement de lignée (elles sont dites Lineage negative ou Lin-), ainsi que l'expression de marqueurs spécifiques (les LT-HSC sont Lin^- $Sca1^+$ $c\text{-}KIT^+$ $CD48^-$ $Thy1.1^{lo}$ $FLT3/FLK2^-$ $CD34^-$ et les ST-HSC sont Lin^- $Sca1^+$ $c\text{-}KIT^+$ $CD48^-Thy1.1^{lo}$ $FLT3/FLK2^{+/-}$ $CD34^+$)(Yang et al., 2005).

Les CSH murines apparaissent entre les stades E10,5-E11 du développement embryonnaire, correspondant à l'hématopoïèse primitive dans trois régions : le sac vitellin, la région aorte-gonade-mesonephros (AGM) et le placenta (pour revue (Dzierzak, 2003)). Ces cellules vont migrer dans le foie fœtal (E15) afin de mettre en place l'hématopoïèse définitive. Elles colonisent ensuite le tissu osseux qui restera le site exclusif de l'hématopoïèse après la naissance.

La quiescence, l'autorenouvellement, la prolifération et la différenciation sont dépendant d'un programme génétique complexe, interagissant avec le microenvironnement cellulaire, au sein de la niche hématopoïétique.

L'engagement des progéniteurs hématopoïétiques dans la différenciation est actuellement admis selon deux modèles : le modèle stochastique, dans lequel un progéniteur s'engage dans une voie de façon aléatoire, avant d'être sélectionné et amplifié au sein d'un environnement permissif, et le modèle instructif, qui attribue aux facteurs de croissance, aux cytokines, aux facteurs de transcription et au microenvironnement un rôle direct dans la

différenciation cellulaire. Ces deux modèles ne sont pas exclusifs et semblent coexister dans certains systèmes.

L'hématopoïèse normale nécessite des interactions complexes bidirectionnelles entre le microenvironnement médullaire (ou niche) et les cellules souches hématopoïétiques. Ces interactions sont critiques pour la maintenance de la quiescence et le nombre des CSH normales. Des perturbations de ces interactions peuvent influencer l'autorenouvellement des CSH. Cette niche est anatomiquement et fonctionnellement définie comme un compartiment endosteal et périvasculaire au sein de la moelle osseuse (Lane et al., 2009).

Les propriétés de ces cellules souches diffèrent au cours des différents stades de la vie. Les CSH médullaires néo-natales ont une capacité supérieure de reconstitution hématopoïétique par rapport aux CSH adultes, cette capacité de donner naissance à des progéniteurs primitifs déclinant progressivement avec l'âge de l'individu (Brown et al., 2002; Rufer et al., 1999). Ces modifications sont sous la dépendance de facteurs génétiques (programme d'expression génique, activité télomérase, altération de l'ADN, modification épigénétique …) et des facteurs extrinsèques du microenvironnement médullaire (Waterstrat and Van Zant, 2009).

Cette connaissance de la cellule souche hématopoïétique et de son environnement est une base essentielle à la réflexion menée pour comprendre les mécanismes de leucémogénèse. De ces études, s'est dégagé le concept de cellules souches leucémiques, dont les propriétés fonctionnelles, le programme transcriptionnel et les interactions avec le microenvironnement, semblent partager de nombreux points communs avec les cellules souches hématopoïétiques normales (cf chapitre cellules souches leucémiques).

3. Programme génétique de la différenciation hématopoïétique

a) Généralités

La maturation des précurseurs hématopoïétiques est associée à deux processus fondamentaux : d'une part, la perte de la capacité d'autorenouvellement des cellules souches, d'autre part, l'engagement de certaines d'entre elles vers des voies de différenciation de plus en plus restreintes (progéniteurs, précurseurs puis cellules différenciées), qui se traduit par l'acquisition de marqueurs spécifiques de lignées.

Ces processus réciproques sont contrôlés par un programme génétique, dans lequel lorsque la cellule souche se destine à la différenciation, les gènes qui maintiennent

l'autorenouvellement sont inhibés, alors que les gènes de la différenciation sont activés (***Figure 2***).

Par exemple, dans la différenciation myéloïde, l'approche expérimentale, par l'utilisation de modèles murins d'invalidation ou d'hyperexpression génique, a permis d'identifier un nombre restreint de facteurs de transcription majeurs, parmi lesquels PU.1, CAAT/enhancer binding proteins (C/EBPα, C/EBPβ, C/EBPε), growth-factor independant 1 (GFI1), interferon-regulatory factor 8 (IRF8), GATA-1 et au niveau des cellules souches, runt-related transcription factor 1 (RUNX1), stem-cell leukemia factor (SCL), GATA-2 et d'autres facteurs, JUNB, Ikaros, MYC, SRF et HMGB3 (Akashi et al., 2000; Fujiwara et al., 1996; McDevitt et al., 1997; Nemeth et al., 2005; Nemeth et al., 2003; Nemeth et al., 2006; Ragu, 2009; Rosenbauer and Tenen, 2007; Shivdasani et al., 1997; Tsai et al., 1994) (***Tableau 1***).

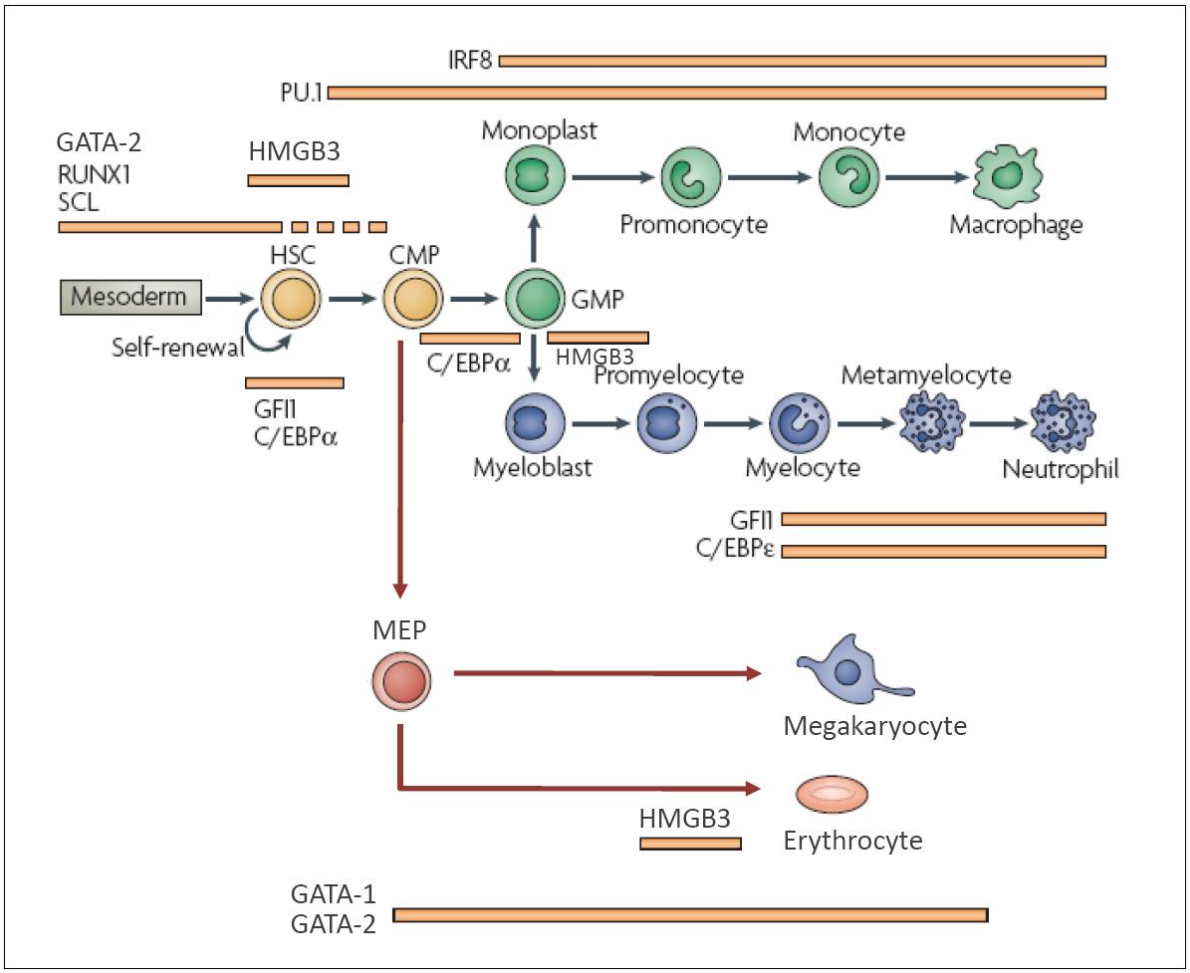


Figure 2: Activation séquentielle des facteurs de transcription dans la différenciation myéloïde. Les barres jaunes indiquent l'expression du gène au cours de la différenciation lignage-spécifique. Figure modifiée, d'après (Rosenbauer and Tenen, 2007).

Facteur de transcription	Site d'expression	Phénotype hématologique chez les souris KnockOut (KO), KnockIn (KI) et KnockOut conditionnels (c-KO)
C/EBPα	Cellules hématopoïétiques (CSH, CMP, CLP, GMP, granulocytes), foie, tissu adipeux	KO: manque de GMP et de granuleux; défaut de monocytes; augmentation des cellules myéloïdes immatures c-KO: même profil que KO et augmentation de l'auto-renouvellement des CSH
C/EBPε	Préférentiellement cellules myéloïdes et lymphoïdes	KO: anomalie de maturation granuleuse tardive, blocage dans le développement éosinophiles, fonction macrophagique déficiente.
GATA 1	Cellules hématopoïétiques (CSH, précurseurs érythroïdes)	KO: létal avec anémie sévère et anomalies de la maturation de la lignée mégacaryocytaire
GATA 2	CSH, cellules souches embryonnaires non hématopoïétiques, bronche, prostate	KO: létal avec anémie sévère
GFI1	Cellules sensorielles épithéliales de l'oreille interne, cellules neuroendocrine des bronches, neutrophiles, cellules B et T, CSH	KO: réduction en progéniteurs lymphoïdes précoces, blocage complet de la maturation granuleuse tardive, déficit en CSH.
HMGB3	Embyogénèse murine, CSH, GMP, CMP	KI: blocage de différenciation lymphoïde B et myéloïde KO: diminution des CLP et CMP, sans anomalie différenciation terminale sauf une augmentation des cellules érythroïdes
IRF8	Cellules hématopoïétiques (cellules B, macrophages, cellules dendritiques, cellules T stimulées)	KO: augmentation de la susceptibilité aux infection virales, augmentation des cellules granuleuses, maladie proche des leucémies myéloïdes chroniques.
PU.1	Cellules hématopoïétiques (CSH, CMP, CLP, GMP, monocytes, granulocytes, cellules B)	KO: manque de cellules matures myéloïdes et cellules B c-KO: blocage avant les stades CMP et CLP, augmentation de la granulopoïèse, déficit en CSH
RUNX1	Cellules hématopoïétiques, tissu nerveux, muscle squelettique, tissu reproductif	KO: défaut de toute l'hématopoïèse définitive c-KO: troubles de la maturation mégacaryocytaire, déficit de développement des cellules B et T, prolifération myéloïde
SCL	Cellules hématopoïétiques (hémanglioblastes, CSH, progéniteurs multipotents, érythrocytes, mégacaryocytes et cellules mastoïdes), cellules endothéliales, tissu cérébral	KO: absence complète de sac jaune hématopoïétique, défaut d'angiogénèse c-KO: diminution des érythrocytes et des mégacaryocytes, défaut en ST-HSC et LT-HSC
SRF	Embryogénèse murine précoce, muscle, cellules hématopoïétiques	KO: létal c-KO: thrombopénie sévère, diminution lymphocytes circulants, augmentation des cellules granulocytaires dans la MO et dans la rate; augmentation des CSH et progéniteurs

Tableau 1 : Phénotypes des souris invalidés pour des facteurs de transcription spécifiques de lignée impliqués dans la maturation myéloïde, modifié d'après (Rosenbauer and Tenen, 2007)

b) Gènes *HOX* et hématopoïèse

Généralités

Dans le programme génétique qui dirige l'hématopoïèse, se distingue le système des gènes homéotiques ou gènes *HOX* (*Hox* chez la souris et *HOM* chez la drosophile), dont l'expression est retrouvée dérégulée dans plus de 50% des hémopathies malignes myéloïdes et lymphoïdes, en particulier dans celles associées aux remaniements du gène *NUP98*. Ce système génique est conservé du nématode aux mammifères et a été étudié dans un premier temps chez la drosophile. Dans cette espèce, il est composé de 8 gènes regroupés (« cluster ») dans moins de 100 kb.

Ces gènes codent pour des facteurs de transcription à homéodomaine (HD), qui contiennent un domaine hélice-boucle-hélice de 61 AA de liaison à l'ADN. Les séquences bordant l'HD influencent la spécificité, en coordonnant l'interaction avec les protéines cofacteurs, modifiant ainsi les propriétés de liaison à l'ADN (Owens and Hawley, 2002). L'HD définit la famille des gènes à homéoboite (ou homeobox). Les gènes homéotiques ne sont qu'un sous-ensemble des gènes à homeobox définis essentiellement par leur organisation spatiale (regroupés) et leur fonction. Par un système d'expression durant le développement embryonnaire, dit de *colinéarité temporo-spatiale* (les gènes centromériques s'expriment les premiers et dans les segments antérieurs, ceux en position télomérique s'exprimant en dernier), ils déterminent la différenciation des métamères. Les mutations dites homéotiques sont celles où un segment (ou métamère) est remplacé par un autre. C'est le cas des drosophiles ayant deux paires d'ailes ou des pattes à la place des antennes. Il s'agit donc d'un système génique pour lequel le mode d'activation dans une cellule (selon sa position sur l'axe antéropostérieur) au cours du développement va déterminer sa différenciation. Chez les mammifères, et chez l'homme en particulier, les *HOX* sont au nombre de 39, issus de duplication génique durant l'évolution. Ils sont regroupés sur 4 chromosomes : en 7p15.2 pour les 11 gènes du complexe *HOX-A*, en 17q21.32 pour les 9 gènes du complexe *HOX-B*, en 12q13.13 pour les 10 gènes du complexe *HOX-C* et sur la bande 2q31.1 pour les 9 gènes du complexe *HOX-D* ***(Figure 3)***. Les gènes ayant une communauté de structure sont dits paralogues. L'organisation des gènes paralogues respecte le principe de colinéarité temporo-spatiale.

Les *HOX* ont la même fonction et le même type d'activation que chez la drosophile. Outre leur rôle dans le développement précoce, ils interviennent de façon déterminante dans l'hématopoïèse.

Expression des HOX dans les progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques.

Les gènes *HOX* sont préférentiellement exprimés dans les populations enrichies en cellules souches hématopoïétiques et les compartiments des progéniteurs, et sont réprimés durant la différenciation et la maturation. Leur rôle, dans l'hématopoïèse normale, a largement été exploré dans des modèles expérimentaux d'hyperexpression, par vecteurs rétroviraux sur moelle osseuse de souris, foie fœtal ou sang de cordon placentaire humain, et par transgénèse de type « Knock out » ou « Knock in » chez la souris. L'ensemble des études a suggéré le rôle important des *Hox* sur la prolifération et la différenciation durant l'hématopoïèse (***Figure 3***).

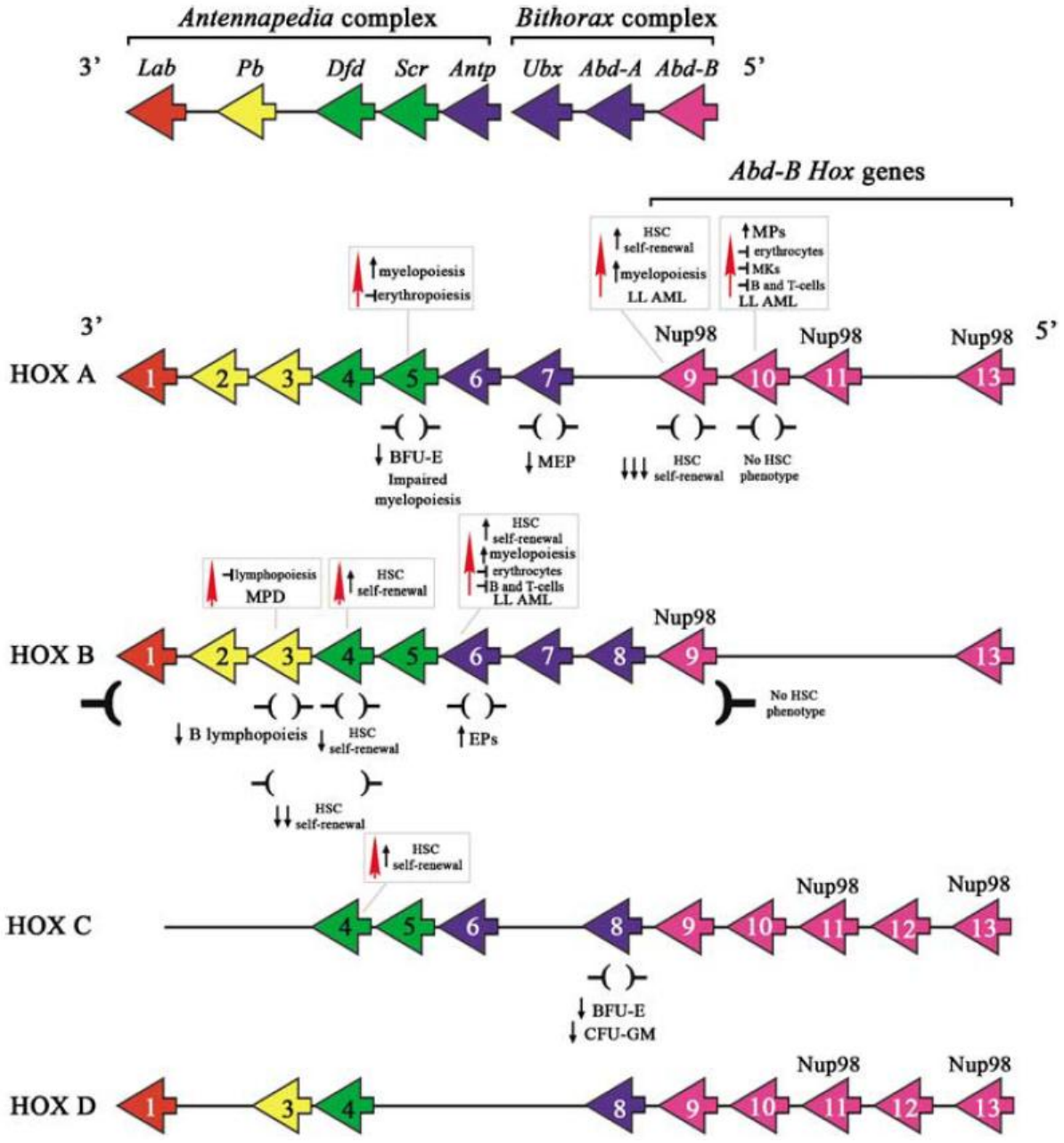


Figure 3 : Organisation du cluster des gènes *HOX* , d'après (Argiropoulos and Humphries, 2007). Les 4 clusters, contenant de 8 à 11 gènes, sont représentés. Les différents gènes sont alignés dans leur groupe paralogue, dont la couleur est associée à l'homologie de leur séquence Homéobox avec les gènes *Hom*-C de la drosophile. Les encadrés résument les principaux phénotypes hématopoïétiques rapportés par la surexpression des différents gènes et les parenthèses situées sous les gènes ou groupes de gènes, résument les effets des modèles de Knock out. Les *HOX* remaniés en pathologie humaine avec le gène *NUP98* sont surmontés de l'indication « Nup98 » (à l'exception de *HOXB3*, modèle expérimental murin). BFUE, erythroid burst-forming unit; CFU-GM, granulocyte/macrophage colony-forming unit; EPs, erythroid progenitors; LL AML, long latency acute myeloid leukemia; MEP, erythroid/megakaryocytic progenitors; MKs, megakaryocytes; MPs, myeloid progenitors; MPD, myeloproliferative disorder.

Les modèles de KO ont démontré que les gènes *Hoxb3* et *Hoxb4* étaient impliqués dans l'autorenouvellement des CSH, sans être nécessaires, suggérant que la perte d'expression pouvait être compensée par d'autres gènes *Hox*. Ainsi, le KO *Hoxb1-Hoxb9*$^{-/-}$, montre-t-il que le cluster *Hoxb* n'est pas indispensable pour l'hématopoïèse normale. L'étude du profil d'expression des cellules c-kit^{+} du foie fœtal des souris KO *Hoxb1-Hoxb9*$^{-/-}$ révèle une hyper-expression de trois gènes *Hoxc* incluant le gène *Hoxc4*, paralogue du gène *Hoxb4*. Ce résultat confirme l'hypothèse d'une compensation et d'une régulation croisée des gènes du cluster *Hox* (Bijl et al., 2006).

L'expression des gènes *Hox* intervient dans le maintien, l'autorenouvellement et le destin des cellules souches hématopoïétiques, ainsi que dans la différenciation myéloïde et lymphoïde B (Sauvageau et al., 1994). L'étude de l'hyper-expression du gène *Hoxb4* montre que son activation est parmi les plus importants stimulants de l'expansion in vitro et in vivo des CSH, par sa capacité à entretenir l'autorenouvellement symétrique des CSH. Cet effet semble modulé par la régulation négative de *PBX1*, l'un des cofacteurs des gènes *HOX* (Cellot et al., 2007).

Contrôle de l'expression des gènes HOX

Les protéines HOX lient des sites d'ADN in vitro avec une certaine sélectivité. Les protéines TALE (three-amino-acid-loop-extension), PBX1 et MEIS1, sont des cofacteurs des HOX, interagissant directement avec les protéines HOX, en augmentant leur spécificité et leur affinité de liaison à l'ADN, ainsi qu'en modifiant leurs propriétés trans-régulatrices (Moens and Selleri, 2006). En général, les protéines HOX des groupes paralogues 1 à 10 interagissent physiquement avec PBX1, alors que les groupes paralogues 9 à 13 interagissent avec MEIS1 (Shen et al., 1997). Ainsi, une perte de fonction des cofacteurs HOX pourrait ainsi entrainer de multiples interruptions des voies de signalisation dépendantes des HOX. De plus, les invalidations de *Pbx1* et *Meis1* sont, lors du développement embryologique, létales et génèrent les mêmes défauts de cellules souches hématopoïétiques, que ceux observés dans les modèles murins de Knock Out *Hox*, indiquant leur rôle dans la prolifération et l'auto renouvellement des CSH (DiMartino et al., 2001; Hisa et al., 2004).

Différents mécanismes épigénétiques contrôlent le maintien de l'expression ou l'extinction de l'expression des gènes homéotiques dans certains types cellulaires. Ils sont principalement contrôlés par le gène *MLL* (Mixed Lineage Leukemia), qui code pour une protéine de la famille Trithorax et par les gènes de la famille des Polycomb, dont le gène

BMI1, par l'intermédiaire de la méthylation de lysines situées sur les queues de l'histone H3 [1] (Guenther et al., 2005; Schuettengruber et al., 2007). D'autre part, la découverte chez la souris, du microARN miR-196b localisé entre les gènes homéotiques *Hox-a9* et *Hox-a10*, et du microARN miR-196a-1 localisé entre *Hox-b9* et *Hox-b1*, réprimant respectivement l'expression d'*Hox-a7* et *Hox-b8*, révèle un nouveau degré de complexité à cette régulation (Lemons and McGinnis, 2006).

Les gènes du programme génétique de l'hématopoïèse, intervenant dans les processus de différenciation et de multiplication cellulaire des cellules souches, des progéniteurs et des précurseurs hématopoïétiques, vont être retrouvés très fréquemment impliqués dans les processus moléculaires de la leucémogénèse.

[1] MLL se fixe près des régions promotrices des gènes activement transcrits, en particulier des gènes *HOXA1, A7, A9, A11* et *A13*, et catalyse par l'intermédiaire de son domaine SET la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4), ce qui maintient la chromatine dans une configuration ouverte. À l'inverse les protéines polycomb, par l'intermédiaire de leur domaine SET catalyse la triméthylation de H3K27 générant alors une configuration fermée de la chromatine.

B. Les leucémies aigües

L'hématopoïèse normale est un processus physiologique complexe, faisant intervenir de multiples facteurs génétiques dont la régulation semble à la fois extraordinairement compliquée et ordonnée. A l'opposé, l'hématopoïèse pathologique, représentée par les leucémies aigües, sera considérée comme l'expression d'une dérégulation des acteurs génétiques clés de l'hématopoïèse normale.

Bien avant de parvenir à l'approche génétique de l'hématopoïèse, les connaissances en hématologie se sont d'abord nourries de l'identification de grands tableaux nosologiques, dont la médecine s'est enrichie au cours du 19e, avec la description des premiers tableaux syndromiques, que l'on a pu rattacher secondairement aux leucémies aigües.

Les améliorations technologiques du 20e siècle ont révolutionné les connaissances de la biologie du vivant et permis une description, sans cesse plus précise, des leucémies aigües, proliférations clonales de cellules cancéreuses se développant aux dépens du système hématopoïétique. Deux groupes de leucémies aigües se sont rapidement dégagés, les formes myéloïdes et les formes lymphoïdes, posant la base des réflexions étio-pathogéniques et thérapeutiques.

Aujourd'hui encore, l'avancée des connaissances biologiques, a permis d'identifier un ensemble de maladies hétérogènes, dont les études minutieuses permettent d'améliorer les connaissances de l'hématopoïèse normale, d'identifier de grands mécanismes de transformation leucémique et à terme de dégager peut-être une ou des grandes cibles de régulation cellulaire, lesquelles pourront conduire à classer ces maladies sous un autre angle nosologique et offriront des cibles thérapeutiques nouvelles.

1. Historique

La première description clinique de la maladie, évoquant la leucémie, date de 1827, par le français Alfred Velpeau, qui réalise l'autopsie d'un homme décédé d'un tableau associant fièvre, fatigue, hépatomégalie, splénomégalie de 4,5 kg et un sang d'aspect blanchâtre. C'est en 1845, qu'une série d'autopsies, conduite par l'écossais John Hugues Benett, confirme ce même tableau, et utilise alors le terme de « leucocythemia ». En 1856, l'allemand Rudolf Virchow identifie, grâce au microscope à lumière, l'excès de leucocytes chez les patients décrits par Velpeau et Benett. Il utilisa alors le terme de « leukemia », des

mots grecs « leucos » et « heima », signifiant « sang blanc ». En 1877, Paul Ehrlich, scientifique allemand, développe la technique du frottis sanguin, permettant de décrire les globules blancs normaux et pathologiques. Le terme de « leucémie aigüe » est introduit en 1889, par Wilhelm Ebstein, médecin allemand, pour différencier les leucémies rapidement progressives et fatales des formes chroniques plus indolentes. Le terme « myéloïde », du grec « myelos » signifiant « moelle », est employé en 1869 par Neumann, qui est le premier à reconnaitre que les globules blancs sont fabriqués dans la moelle osseuse, par opposition à la rate. Les techniques d'examen de la moelle osseuse permettent la description biologique de la leucémie en 1879, par Mosler. Enfin, c'est en 1900, que le « myéloblaste », cellule maligne de la leucémie aigüe myéloblastique, est caractérisé par Naegeli, qui divise alors les leucémies en forme myéloïde et lymphocytique.

2. Classification des hémopathies malignes humaines

Outre le cadre nosologique descriptif de maladies hématologiques, la nécessité d'une nosographie précise est apparue au début des années 70, pour uniformiser la nomenclature et la classification des leucémies aigües.

Le fruit de ce premier travail au sein d'un groupe international de chercheurs français, américains et britanniques a permis d'élaborer une nouvelle classification des leucémies aigües, en comparant les données biologiques, cytologiques et cytochimiques des dossiers médicaux de centaines de patients leucémiques. Ce travail a abouti à la classification franco-américano-britannique (FAB) des leucémies aigües, divisée en deux groupes « lymphoblastique » et « myéloblastique », eux-mêmes sub-divisés respectivement en trois et six groupes (Bennett et al., 1976). Cette classification est toujours utilisée à ce jour.

Dans cette même approche, le groupe EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) a proposé une classification immunologique des leucémies, permettant notamment, par un système de score, d'améliorer la classification des leucémies mixtes ou bi phénotypiques (Bene et al., 1998; Bene et al., 1999; Bene et al., 1995).

Aujourd'hui, le diagnostic de leucémie aigüe nécessite une approche multiparamétrique, dont le but est d'identifier correctement la maladie (cytologie, cytochimie, phénotype immunologique, anomalies cytogénétiques, anomalies récurrentes des gènes de fusion, profil d'expression de transcrits spécifiques) et ainsi de reconnaitre précocement les éléments pronostiques défavorables, permettant d'ajuster la thérapeutique au risque.

L'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) a intégré progressivement l'ensemble de ces données, proposant une classification des hémopathies malignes, dont la dernière mise à jour date de 2009 (Vardiman et al., 2009). Cette classification distingue deux grands types d'hémopathie maligne:

Les Néoplasies myéloïdes : définissent toutes les maladies développées aux dépens des lignées granuleuses (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), monocytes-macrophages, érythroïde et mégacaryocytaire. On distingue de manière simplifiée : les ***néoplasies myéloprolifératives***, caractérisées par une prolifération anormale d'une ou plusieurs lignées myéloïdes. Il s'agit principalement de la leucémie myéloïde chronique, de la splénomégalie myéloïde, de la thrombocythémie essentielle et de la polyglobulie de Vaquez ; les ***syndromes myélodysplasiques***, caractérisés par des anomalies de maturation d'une ou plusieurs lignées myéloïdes, pouvant être associées à des anomalies quantitatives. En l'absence de traitement, ces entités ont un potentiel évolutif en leucémie aigüe myéloblastique. Les ***leucémies aigües myéloblastiques*** correspondent à des proliférations intra-médullaires de précurseurs myéloïdes, responsable d'une insuffisance médullaire par envahissement, et d'un passage anormal de ces cellules immatures dans le sang périphérique. Il existe des leucémies aiguës ambiguës dont les cellules expriment des marqueurs myéloïdes et lymphoïdes.

Les Néoplasies à précurseurs lymphoïdes : correspondent à des proliférations de précurseurs lymphoïdes B ou T, qui définissent deux types immunophénotypiques (B ou T) et deux entités : les ***lymphomes*** si la prolifération est limitée à un tissu extramédullaire ; les ***leucémies aiguës à précurseurs lymphoïdes***, si l'envahissement médullaire par les cellules tumorales immatures est supérieur à 20%, ou supérieur à 25% s'il existe une prolifération tissulaire extramédullaire associée.

3. Épidémiologie

Les hémopathies malignes représentent environ 7 % des cancers tous âges confondus. En 2002, le nombre de nouveaux cas estimé dans le monde était de 750 000 (Ferlay et al., 2004). En France, en 2000, on estimait le nombre de cas incidents à un peu moins de 280 000 cancers. Le nombre de patients diagnostiqués pour une leucémie aigüe était d'environ 2500 nouveaux cas, dont environ 450 concernant l'enfant de moins de 15 ans (Clavel et al., 2004; Remontet et al., 2002).

La répartition des leucémies aigües et leur pronostic varient selon l'âge et le type myéloïde et lymphoïde. Chez les enfants (de 1 à 15 ans), 80 % des leucémies aigües sont des formes lymphoblastiques, alors que ces maladies sont proportionnellement rares chez l'adulte. Les formes myéloblastiques sont principalement retrouvées à l'âge adulte. Le pronostic des formes pédiatriques diffère fortement du pronostic des formes adultes. La survie à 5 ans, des leucémies aigües de l'enfant (1 à 15 ans), était estimée à 82 % pour les LAL et à 58 % pour les LAM à la fin des années 1990, alors que la survie pour les enfants de moins de 1 an est respectivement de 48 et 45% (Goubin et al., 2006). Dans les formes de l'adulte, le pic d'incidence des LAM est à 60 ans et la survie est de 20 à 30 % (Shipley and Butera, 2009) ; la survie des LAL est d'environ 35% (Rowe, 2009).

Malgré les progrès constants des polychimiothérapies, la mortalité liée aux leucémies ou à leur traitement reste importante, en particulier dans la population adulte. La recherche fondamentale, explorant les mécanismes de leucémogénèse, représente un espoir majeur pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, permettant d'améliorer la survie des patients enfants ou adultes atteints de leucémies aigües.

4. Cellules souches leucémiques

La différenciation hématopoïétique est un processus hiérarchique, étroitement régulé à chaque étape, depuis la capacité d'autorenouvellement de la cellule souche hématopoïétique jusqu'aux capacités de différenciation des progéniteurs. Il est ainsi apparu l'hypothèse qu'une dérégulation de cette homéostasie pourrait être à l'origine du processus de cancérogénèse.

Partant de l'observation que les cancers sont généralement monoclonaux dans leur nature, avec des populations cellulaires hétérogènes à différents degrés de différenciation, il a été formulé l'hypothèse que le cancer pourrait être organisé dans une hiérarchie cellulaire similaire à l'hématopoïèse avec une cellule souche cancéreuse au sommet de cette hiérarchie (Chao et al., 2008).

Identifier la cellule capable de maintenir le cancer est fondamental, car cette cellule souche cancéreuse représente la cible idéale des traitements anticancéreux, pour permettre l'éradication du cancer.

Les cellules souches normales et leucémiques partagent certains critères phénotypiques (Blair et al., 1998; Bonnet and Dick, 1997; George et al., 2001). La possibilité de réaliser des transplantations successives a permis d'attester des capacités de maintenance,

ou d'autorenouvellement des progéniteurs leucémiques (Hope et al., 2004). Dans le système hématopoïétique, l'expression de l'oncogène BCR-ABLp210, sous le contrôle du promoteur du gène *Sca1,* récapitule la leucémie myéloïde chronique avec l'ensemble de ces éléments différenciés et montre, que le potentiel tumorigène est restreint au compartiment cellulaire Sca-1^{+} et est absent des cellules plus matures Sca-1^{-} (Perez-Caro et al., 2009). Très récemment, l'existence d'une structure hiérarchique au sein de la population pré-leucémique (à l'instar de la structure hiérarchique existante au sein de la population leucémique) a été apportée dans le cadre de l'analyse d'une leucémie aiguë lymphoblastique B *TEL-AML1*, développée par une fillette, dont la sœur jumelle n'était pas atteinte. Cette étude a permis d'identifier chez les deux fillettes, jumelles monozygotes monochorioniques, une population de cellules pré-leucémiques d'immunophénotype CD34^{+}CD38$^{-/low}$CD19^{+}, présentant des capacités d'autorenouvellement et un profil d'expression génique évoquant celui des CSH, capables d'initier et de maintenir un état pré-leucémique *in vivo* en souris NOD/SCID, et de fournir des cellules plus matures (Hong et al., 2008). La fonction des cellules souches normales et leucémiques semble régulée par des déterminants communs. Par exemple, la fonction de *Bmi1,* impliqué dans l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques embryonnaires et adultes, est conservée dans les cellules souches leucémiques (CSL), (Lessard and Sauvageau, 2003a; Lessard and Sauvageau, 2003b). L'expression d'un certain nombre de gènes *HOX,* dans les CSL, rappelle le profil d'expression de ces gènes dans les CSH normales (Abramovich and Humphries, 2005).

Le modèle de la LMC (associée à la translocation t (9;22) et au gène de fusion *BCR-ABL*) montre qu'un événement oncogénétique bien caractérisé peut atteindre la CSH normale et engendrer une hémopathie (Jamieson et al., 2004b; Passegue et al., 2003; Satoh and Ogata, 2006). La comparaison du profil d'expression génique, de progéniteurs leucémiques et normaux partageant un même phénotype, fournit également des arguments sur la « leucémisation » de cellules souches normales (Beachy et al., 2004; Gal et al., 2006). Néanmoins, l'évolution de la LMC, de sa phase chronique vers sa phase aiguë, constitue l'exemple d'un événement moléculaire affectant un progéniteur en aval de la CSH, et conduisant à la ré-acquisition d'un élément du phénotype des CSH : l'autorenouvellement (Jamieson et al., 2004a). D'autres anomalies moléculaires (comme l'expression des protéines de fusion MLL-ELL et MLL-GAS7) peuvent induire des caractéristiques de cellules souches dans des progéniteurs situés en aval dans la hiérarchie de l'hématopoïèse (Cozzio et al., 2003). Il est probable, que la nature de l'événement oncogénique initial, soit primordiale dans

les conséquences fonctionnelles sur la population cible, et que certains événements oncogéniques, mais pas tous (pour exemple la fusion *MLL-ENL* (So et al., 2003a)), puissent «rétablir» des caractères souches dans une population de progéniteurs (Cozzio et al., 2003; Krivtsov et al., 2006; Somervaille and Cleary, 2006). Plus récemment, Somervaille et al démontrent que les CSL MLL des leucémies myéloblastiques sont directement situées en aval des progéniteurs myéloïdes, occupant le sommet de la hiérarchie des cellules leucémiques, et qu'ils maintiennent un état d'autorenouvellement par un programme génétique, plus semblable aux cellules souches embryonnaires, qu'aux cellules souches adultes (Somervaille et al., 2009).

Comme dans d'autres modèles de relations hôte-tumeur, la leucémogénèse implique aussi une dérégulation des interactions entre la CSH normale et son microenvironnement physiologique, la niche hématopoïétique (Clarke and Fuller, 2006; Lane et al., 2009). L'invalidation du gène *Rb* dans le microenvironnement conduit à la disparition des niches ostéoblastiques, l'apparition d'une hématopoïèse extramédullaire dans la rate et le foie, perturbe l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation des CSH et finalement autorise le développement d'un syndrome myéloprolifératif (SMP) (Walkley et al., 2007b). De même, une perte de fonction de *RARα* dans la niche conduit au développement d'un SMP (Walkley et al., 2007a). Par ailleurs, l'influence de l'environnement cellulaire (contexte myéloïde ou lymphoïde), sur le devenir de cellules $CD34^+$ exprimant la protéine de fusion MLL-AF9 et la nature des leucémies développées après transferts adoptifs en souris immunodéficientes, a été établie par le groupe de James C. Mulloy (Wei et al., 2008). Ces trois études montrent qu'un processus de transformation peut survenir ou être influencé dans/par un environnement physiologique perturbé, et ne pas être uniquement la conséquence des anomalies moléculaires affectant les cellules hématopoïétiques. La prise en compte de cette interaction des CSL avec la niche fait l'objet de réflexions sur la mise au point de thérapeutiques spécifiques (voir pour revue (Lane et al., 2009)).

C. Anomalies génétiques dans les hémopathies malignes.

L'identification des anomalies clonales récurrentes, présentes dans les hémopathies malignes, par l'analyse systématique des caryotypes médullaires des leucémies aigües, a permis d'apporter deux types d'information : en clinique, identifier des marqueurs spécifiques ou pronostiques dans certaines hémopathies malignes ; en recherche, identifier des gènes importants dans l'hématopoïèse et décrypter des grandes voies ou mécanismes, impliqués dans la leucémogénèse.

1. De la cytogénétique à la biologie moléculaire

Les anomalies cytogénétiques et moléculaires récurrentes, recensées dans les hémopathies malignes, ont été caractérisées progressivement, au fur et à mesure de la mise au point des différentes techniques diagnostiques.

Le caryotype normal avec la description d'une cellule humaine à 46 chromosomes a été établi en 1956. En hématologie maligne, la cytogénétique apparait en 1960, avec la mise en évidence d'une anomalie récurrente, le chromosome « Philadelphie », dans la leucémie myéloïde chronique par Peter Nowell et David Hungerford. La technique de cytogénétique s'améliore au début des années 1970, avec la mise au point du « banding », permettant de préciser les points de cassure sur les différents chromosomes. Le chromosome Philadelphie est ainsi identifié en 1970, comme un chromosome 22 remanié, puis secondairement en 1973, comme étant une translocation t(9 ;22)(q34 ;q11) (Clarkson et al., 2003).

Dans le début des années 1980, la mise au point de la technique de FISH va permettre de préciser les anomalies de structure à l'échelle moléculaire et de caractériser des anomalies cytogénétiques cryptiques récurrentes, non visualisables par les techniques de caryotype en bandes. Cette technique a permis, par exemple, au début des années 1990, de mettre en évidence la translocation cryptique t(12;21)(p13;q22), qui fusionne les gènes *ETV6*, localisé sur le chromosome 12, et *RUNX1*, localisé sur le chromosome 21. Cette anomalie récurrente est fréquente dans les leucémies aigües lymphoblastiques de la lignée B de l'enfant (Romana et al., 1994).

La cytogénétique a parfois permis de décrire, à partir d'une anomalie chromosomique rare, un mécanisme oncogénétique fréquent. A titre d'exemple, la translocation t(7 ;9)(q34 ;q34), qui entraine une activation constitutionnelle de Notch1, est présente dans

moins de 1% des leucémies aigües lymphoblastiques T (Ellisen et al., 1991; Grabher et al., 2006). Néanmoins, l'implication de Notch1 dans l'oncogenèse lymphoblastique T a été largement démontrée ensuite par l'identification des mutations « gains de fonction », qui sont présentes dans 50 % des LAL-T humaines (Weng et al., 2004).

Aujourd'hui, les nouveaux outils d'analyse génomique plus précis, comme la CGH array, permettent d'observer des déséquilibres génomiques multiples, non visualisés sur un caryotype standard, ou en cas d'échec de cette technique. La CGH array, qui permet une étude pangénomique, était initialement utilisée en recherche. Elle commence à trouver une place dans la prise en charge clinique des patients. Ainsi, en oncologie pédiatrique, l'étude des déséquilibres génomiques des échantillons tumoraux de neuroblastomes permet d'établir un marqueur pronostique d'évolution, qui sera à terme intégré dans la stratégie thérapeutique (Janoueix-Lerosey et al., 2009). En hématologie maligne, les techniques d'étude moléculaire pangénomique, avec les puces hautes résolutions de type SNP-array, ont récemment permis de mettre en évidence le caractère péjoratif des mutations du gène Ikaros, dans les leucémies aigües lymphoblastiques de la lignée B (Mullighan et al., 2009).

2. Anomalies chromosomiques

Les anomalies chromosomiques de nombre ou de structure, équilibrées ou déséquilibrées ont été les premières à être décrites dans les hémopathies malignes.

a) Anomalies de structure et recombinaisons géniques

L'analyse cytogénétique des échantillons de cellules cancéreuses, permet de recenser actuellement, environ 360 anomalies de structures chromosomiques (majoritairement des translocations équilibrées) dans les cancers humains, impliquant 337 gènes différents. La majorité de ces anomalies (75%) touche des leucémies aigües, 267 sont décrites dans les LAM, 155 dans les LAL. Leur fréquence est de l'ordre de 20 % des LAM et 15 à 30 % des LAL (Mitelman et al., 2007).

Une quinzaine de ces anomalies chromosomiques équilibrées représentent en fréquence la majorité des anomalies retrouvées dans les leucémies aigües (***Tableau 2***). Elles sont souvent rapportées à un type particulier de leucémies et certaines d'entre elles sont pathognomiques de la maladie, comme la t(9 ;22), signature cytogénétique de la leucémie myéloïde chronique, dans les syndromes myéloïdes chroniques.

Réarrangement chromosomique équilibré	Gène de fusion	Caractéristiques cliniques
t(1;19)(q22;p13)	*E2A-PBX1*	Leucémies aigües de la lignée B (5 à 6% des LAL de l'enfant)
t(1;22)(p13;q13)	*RBM15–MKL1 (OTT-MALL)*	Leucémies aigües mégacaryocytaires du nourrisson
t(2;5)(p23;q35)	*NPM1–ALK*	Lymphomes anaplasiques à cellules T de l'enfant de l'adolescent
t(8;14)(q24;q32)	*IGH–MYC*	Lymphomes et leucémies de Burkitt; Très agressifs, bon pronostic avec chimiothérapie intensive
t(8;21)(q22;q22)	*RUNX1–ETO*	Leucémies aigües myéloblastiques, type M2 (dans 30% des LAM2); bon pronostic
t(9;22)(q34;q11)	*BCR–ABL1*	Leucémies myéloïdes chroniques (90% des cas) ou leucémies aigües lymphoblastiques; sensible à l'imatinib et autres inhibiteurs de tyrosine kinase
11q23 réarrangements	*MLL-partenaires*	Leucémies aigües; dans 70% des leucémies aigües lymphoblastiques du nourrisson; mauvais pronostic
t(12;21)(p13;q22)	*ETV6–RUNX1 (TEL-AML1)*	Leucémies aigües lymphoblastiques de la lignée B de l'enfant (dans 20% des cas); Bon pronostic
t(14;16)(q32;q23)	*IGH–MAF*	Myélomes multiples, mauvais pronostic
t(15;17)(q22;q21)	*PML–RARA*	Leucémies aigües promyélocytaires, sensibles à l'acide tout-transrétinoïque, bon pronostic
inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22)	*CBFB-MYH11*	Leucémies aigües myéloblastiques à éosinophiles
Autre réarrangement chromosomique	**Gène cible**	**Caractéristiques cliniques**
1q32 réarrangements	*TAL-1*	Leucémies aigües lymphoblastiques T de l'enfant; présente dans 20 à 30% des cas
t(5;14)(q35;q32)	*HOX11L2*	Leucémies aigües lymphoblastiques de la lignée T de l'enfant; présente dans 25% des cas.

Tableau 2 : Principales anomalies structurales cytogénétiques récurrentes dans les hémopathies malignes. Anomalies les plus fréquentes, pathognomoniques d'une forme spécifique, ou d'un pronostic particulier.

Sur le plan moléculaire, elles aboutissent généralement à la fusion au point de cassure chromosomique de deux gènes, générant ainsi un gène chimérique hybride, dont les conséquences moléculaires peuvent être classiquement de deux types. Le premier est l'expression ectopique ou l'hyperexpression d'un oncogène. Dans ce cas de figure, l'oncogène est placé, du fait du remaniement chromosomique, sous la dépendance d'un élément de régulation positif de gènes physiologiquement très exprimés dans les cellules hématopoïétiques. Le paradigme de cette situation est représenté par les 3 translocations récurrentes, t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p11;q24) et t(8;22)(q24;q11), associées aux lymphomes de Burkitt (Taub et al., 1982). Celles-ci placent l'expression de l'oncogène *c-MYC*, sous la

dépendance des enhancers des gènes des immunoglobulines, entrainant une hyperexpression de l'oncogène *c-MYC* dans les lymphocytes à l'origine de leur transformation. Cette situation est régulièrement retrouvée dans les lymphomes et dans les LAL de la lignée T.

La deuxième situation est la recombinaison, aux points de cassure du remaniement chromosomique, de deux gènes au niveau de deux de leurs introns et sans qu'il ait une altération des phases de lecture. Cela aboutit à la formation d'un ARN de fusion, codant pour une protéine chimérique (parfois deux, du fait de la fusion réciproque), qui conserve des motifs fonctionnels des protéines sauvages. Le cas emblématique de cette situation est la fusion *BCR-ABL,* générée par la translocation t(9;22)(q34;q11.2). L'étude structurale de cette protéine hybride montre que pratiquement toute la protéine ABL, en particulier ces domaines actifs tyrosine-kinase, sont fusionnés avec la partie N-terminal de BCR, ce qui va entrainer la dimérisation de la protéine BCR–ABL. Cette dimérisation va provoquer une activation constitutive d'ABL, aboutissant à une activation de la multiplication cellulaire, indépendante des facteurs de croissance et de ce fait, à la leucémie myéloïde chronique (Clarkson et al., 2003; Faderl et al., 1999).

b) Déséquilibres génomiques

Les anomalies chromosomiques déséquilibrées (avec perte ou amplification de matériel génétique), comme les monosomies, les délétions, les trisomies ou duplications, sont également associées aux leucémies aigües. Les conséquences oncogénétiques des ces anomalies dans la fonction cellulaire sont souvent moins bien comprises.

Les ***hyperdiploïdies*** (51 à 67 chromosomes) sont présentes chez 25 à 30 % des leucémies aigües pédiatriques de la lignée B et sont associées dans cette maladie à un critère de bon pronostic. Elles sont beaucoup moins fréquentes chez l'adulte et sont rares dans les leucémies aigües de la lignée T. Les gains de chromosomes ne sont pas aléatoires et impliquent le plus fréquemment l'addition des chromosomes 4, 6, 10, 14, 17, 18 et 21. Les mécanismes initiateurs de ces anomalies ne sont pas identifiés, mais il existe fréquemment des anomalies associées, suggérant là encore, le scénario d'une transformation multi-étape (Paulsson and Johansson, 2009).

L'***amplification intra-chromosomique du chromosome 21*** (iAMP21) est détectée chez 1 à 2% des leucémies aigües lymphoblastiques de l'enfant. Bien que les anomalies morphologiques puissent être multiples, elles sont toujours associées à des amplifications du

gène *AML1* (*RUNX1*), répétées en tandem le long du chromosome anormal. Cette anomalie serait associée à un pronostic défavorable (Moorman et al., 2007; Perez-Vera et al., 2008).

Les ***délétions du chromosome 5*** sont parmi les plus communes et les plus fréquentes décrites dans les syndromes myélodysplasiques, les leucémies aiguës myéloblastiques et les acutisations de syndromes myélodysplasiques. Les anomalies touchent le plus souvent le bras long du chromosome 5 (del5q). La cartographie cytogénétique de cette région a identifié en 5q31 et 5q32 des candidats gènes suppresseurs de tumeur. Des études expérimentales, chez la souris, ont suggéré le rôle du gène *mDia1*, comme nœud central dans le réseau suppresseur de tumeur, qui implique plusieurs gènes situés en 5q. Ce réseau fournirait un mécanisme d'homéostasie, équilibrant la croissance et la différenciation, des précurseurs et des cellules souches hématopoïétiques (Eisenmann et al., 2009).

La présence d'une ***monosomie 7*** dans les leucémies aigües myéloblastiques est un critère de sévérité associé à un mauvais pronostic (Hasle et al., 2007).

Certaines leucémies aigües myéloblastiques présentent des aberrations chromosomiques multiples. On parle de ***caryotype complexe*** lorsqu'il y a plus de 3 anomalies chromosomiques de structure ou de nombre. Ces leucémies à caryotype complexe touchent préférentiellement les personnes âgées et sont associées à une valeur pronostique défavorable (Chen et al., 2007; Mrozek, 2008).

3. Les mutations géniques

Dans certaines hémopathies malignes, les techniques de cytogénétique classique et moléculaire (FISH ou CGH array) ne mettent pas en évidence de remaniement structural ou de nombre des chromosomes. Dans ces situations, il a été observé des mutations concernant des gènes parfois déjà impliqués dans des remaniements chromosomiques. De nombreuses études ont largement démontré que ces mutations peuvent, ou être isolées, ou accompagner des anomalies chromosomiques.

Dans les ***leucémies aigües myéloblastiques***, plusieurs mutations récurrentes sont largement étudiées.

Le gène ***FLT3,*** qui code pour un récepteur de tyrosine kinase, peut être activé constitutionnellement, par une duplication interne en tandem (IDT, internal duplication tandem). FLT3 et son ligand sont importants dans l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques, ainsi que pour l'expansion des cellules dendritiques et NK matures. Cette

mutation est rapportée dans environ 30% des leucémies aigües myéloblastiques de l'adulte et est associée à un pronostic pauvre (Levis and Small, 2003).

La mutation, par insertion dans l'exon 12, du gène ***NPM1*** (Nucleophosmin) est retrouvée chez 27,5% des patients présentant une leucémie aigüe myéloblastique, dont la majorité présente un caryotype normal. Cette mutation est associée dans 44% des cas à la mutation *FLT3 ITD*. Lorsque la mutation est seule présente, le pronostic de la maladie semble être meilleur, que lorsqu'il est associé à la mutation de *FLT3 ITD* (Falini et al., 2005; Grisendi et al., 2006; Schnittger et al., 2005; Thiede et al., 2006). *NPM1* code pour une protéine naviguant entre le noyau et le cytoplasme, avec une localisation principalement nucléaire. Il régule la voie ARF-p53, suppresseur de tumeur. La mutation du gène *NPM1* entraine une relocalisation cytoplasmique de la protéine NPM. Une étude de la voie ARF-p53, dans des lignées NIH-3T3, exprimant le mutant NPM1, montre que cette cible n'est pas suffisante pour induire les propriétés oncogéniques de NPM1 muté (den Besten et al., 2005).

RUNX1 (*AML1*) se trouve muté dans 10 à 20% des syndromes myélodysplasiques et leucémies aigües myéloblastiques (Harada and Harada, 2009).

NRAS est un gène de la famille des oncogènes *RAS*, qui codent pour des protéines de membrane, régulant le signal de transduction de plusieurs récepteurs de membrane, et joue des rôles importants dans la régulation des processus de prolifération, différenciation et apoptose. Il est muté dans 10% des LAM de l'adulte, sans impact pronostique sur la survie (Bacher et al., 2006). ***KRAS***, un autre gène des la famille *RAS*, est muté dans 5% des LAM (Bowen et al., 2005).

CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein-alpha) code pour un facteur de transcription, exprimé dans de nombreux tissus, qui régule notamment la prolifération et contrôle la différenciation terminale granulocytaire (Mueller and Pabst, 2006). Deux types de mutations sont décrits dans les leucémies aigües myéloblastiques : les mutations tronquant la partie N-terminale et les mutations des domaines bZip. Ces deux types sont fréquemment associés. Ces mutations sont présentes chez 4 à 11% des patients adultes et chez 4,5% des patients pédiatriques. Dans ces deux groupes, ces mutations sont associées à un pronostic plus favorable sur la survie (Ho et al., 2009).

L'utilisation des ***techniques de séquençage à haut débit*** permet d'identifier de nombreuses autres mutations, dans des gènes d'intérêt suspectés par leur fonction, mais

également d'identifier de nouvelles mutations dans des gènes dont l'implication est déjà démontrée dans les LAM. La difficulté pour interpréter ces anomalies est de comprendre, si ces mutations sont des mutations « passagères », survenant au cours du processus de transformation, mais sans impact sur la maladie elle-même, ou au contraire, si elles sont « conductrices », c'est-à-dire importante dans le processus qui conduit la cellule à son devenir leucémique. Des travaux, sur le gène *FLT3*, a clairement démontré l'existence de nombreuses autres mutations dans des domaines non fonctionnels, sans retentissement apparent sur la fonction tyrosine kinase (Frohling et al., 2007).

Une étude pan-génomique sur les LAM de type M1, à caryotype normal, a mis en évidence 8 nouvelles mutations somatiques ; 4 affectent des familles de gènes fortement associés au cancer : *PTPRT*, *CDH24*, *PCLKC* et *SLC15A1* ; 4 affectent des gènes non connus pour être liés au cancer : *KNDC1*, *GPR123*, *EBI2* et *GRINL1B* (Ley et al., 2008). Des études complémentaires seront nécessaires pour identifier d'éventuelles voies de signalisation impliquées dans les processus de leucémogénèse.

Enfin, l'étude du transcriptome, de certains échantillons de leucémies aigües, a montré des modifications de l'expression de certains gènes. Par exemple, indépendamment des anomalies structurales et moléculaires de l'ADN, le gène ***WT1*** (Wilms Tumor 1) est fortement exprimé dans 70 à 90 % des patients avec une leucémie aigüe myéloblastique. *WT1* est un gène suppresseur de tumeur, dont la mutation a été identifiée chez 5 à 10 % des néphroblastomes de l'enfant et chez plus de 90 % des enfants présentant un syndrome de Denys Drash (Little and Wells, 1997). *WT1* semble également impliqué dans la différenciation des cellules hématopoïétiques humaines (Ellisen et al., 2001). Des mutations de *WT1* sont également décrites et semblent être associées à un pronostic défavorable dans les LAM (King-Underwood and Pritchard-Jones, 1998; Renneville et al., 2009).

Les anomalies géniques associées aux ***leucémies aigües lymphoblastiques*** sont également décrites.

Plus de 50% des leucémies aigües lymphoblastiques T de l'enfant sont associées à une mutation activatrice de ***NOTCH1***, gène codant pour un récepteur transmembranaire impliqué dans la régulation du développement lymphocytaire T (Weng et al., 2004). Des anomalies d'expression de différents oncogènes sont présentes dans les LAL T, dont la relevance pronostique est discutée : *TAL1, LY1, TLX1/HOX11, TLX3/HOX11L2* (Vrooman and Silverman, 2009).

Dans les ***syndromes myéloïdes chroniques***, deux autres exemples récents peuvent être cités : la mutation activatrice du gène *JAK2* (*JAK2 V617F*), qui est observée dans une majorité de polyglobulie de Vaquez, et 50 % des thrombocytoses essentielles et myélofibroses primitives (Levine et al., 2005; Vainchenker et al., 2008) ; et les mutations du gène *TET2*, plus récemment identifiées, retrouvées dans un large panel d'hémopathies myéloïdes malignes variées (syndromes myélodysplasiques, polyglobulies de Vaquez, thrombocytoses essentielles, myélofibroses primitives, leucémie myélomonocytaire chronique, leucémie aigüe myéloblastique primitive et secondaire, mastocytoses…) avec une fréquence globale, qui peut être estimée à environ 15 % (Delhommeau et al., 2009).

4. Coopération oncogénique

L'identification de marqueurs moléculaires multiples, dans les leucémies aigües myéloblastiques à caryotype normal, a suggéré le concept selon lequel la leucémogénèse était la résultante de multiples évènements mutationnels, dont la coopération favorisait le processus de transformation. L'instabilité du génome dans les cellules blastiques est clairement admise dans la pathogénèse des LAM. Ces perturbations résultent de la dérégulation de gènes impliqués dans la maintenance cellulaire et dans la réparation de l'ADN.

Les mutations de « classe I » confèrent un avantage prolifératif ou de survie aux progéniteurs hématopoïétiques, alors que les mutations de « classe II », affectent la différenciation hématopoïétique et confèrent des propriétés d'autorenouvellement (***Figure 4***). Il est généralement considéré que les mutations de *FLT3, c-KIT* et *N-RAS* sont des mutations de classe I, et que *C/EBPA*, les mutations d'*AML1*, les fusions *AML1/ETO, CBFB/MYH11, PML/RARA* et *MLL* relèvent de la classe II. Le positionnement de certaines mutations telles que *NPM1* n'est pas clair (Haferlach, 2008; Ishikawa et al., 2009; Renneville et al., 2008). Des exemples de coopération ont été démontrés expérimentalement chez la souris : *PML-RARa* et *FLT3-ITD* (Kelly et al., 2002), *BCR-ABL* et *NUP98-HOXA9* (Dash et al., 2002; Mayotte et al., 2002), *TEL-PDGFβR* et *AML1-ETO* (Grisolano et al., 2003), *NUP98-HOXA9* et *FLT3-ITD* (Palmqvist et al., 2006) et *MLL-AF9* et *FLT3* (Stubbs et al., 2008) pour exemples.

Les travaux de Mullighan et al, portant sur l'étude par SNP array des échantillons de LAL de la lignée B, ont illustré de façon remarquable les phénomènes de coopération génique dans les LAL de la lignée B, associées à un chromosome philadelphie (Mullighan et al., 2007; Mullighan et al., 2008; Mullighan et al., 2009).

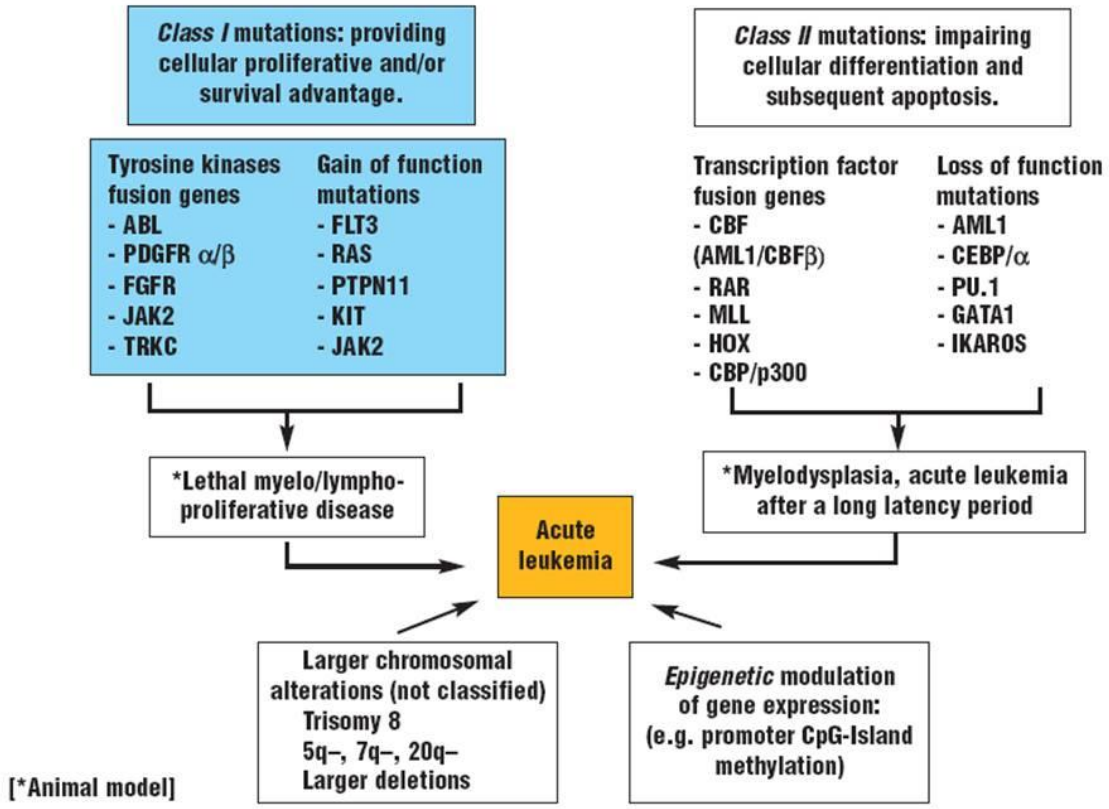


Figure 4 : Représentation de la coopération génétique impliquée dans la leucémogénèse (d'après (Chalandon and Schwaller, 2005)).

Dans cette étude, 66 % des patients, présentant une leucémie aiguë lymphoblastique à haut risque NCI, présentait une altération d'au moins un gène du développement lymphoïde B non détecté par le caryotype. Parmi les gènes identifiés, les anomalies structurales du gène *IKZF1* ou Ikaros (délétions ou mutations) représentent un élément pronostique défavorable, indépendant des autres critères pronostiques connus, pointant probablement la fonction d'un gène majeur dans le processus de leucémogénèse ou dans le processus de résistance à la chimiothérapie. De manière tout à fait intéressante, le profil d'expression des patients présentant une anomalie d'IKZF1, est superposable au transcriptome d'échantillons leucémiques avec translocation t(9 ;22), qui sont des leucémies connues à haut risque d'évolution défavorable. L'hypothèse formulée serait que la perte de fonction d'Ikaros sur la différenciation B, par haplo-insuffisance ou expression d'un dominant négatif, empêcherait la différenciation lymphoïde B, conférant ainsi aux cellules leucémiques des propriétés de cellules souches, connues pour être résistantes aux chimiothérapies.

5. Gènes à multipartenaires

L'étude systématique des échantillons de cellules leucémiques a permis de démasquer des gènes hautement remaniés, fusionnant avec des gènes partenaires multiples et variés. Ces gènes, dits gènes « multipartenaires », sont en nombre restreints. Cette particularité en fait des outils de recherche particulièrement intéressants pour décrypter les mécanismes de leucémogénèse. En effet, la mise en évidence de gènes à multipartenaires révèle l'existence de grandes voies moléculaires liées à la transformation cellulaire, ce qui est d'une importance capitale pour la nosologie et la thérapeutique. C'est par exemple le cas des gènes *TEL/ETV6*, *RUNX1* et *MLL* (Bohlander, 2005; Wang et al., 2010). Ce dernier étant le plus fréquemment retrouvé remanié dans les hémopathies malignes va nous servir d'exemple.

L'étude des réarrangements *MLL* est un modèle particulièrement riche et instructif dans la compréhension des mécanismes de leucémogénèse. Les particularités des remaniements *MLL* sont multiples : grande fréquence dans les leucémies du nourrisson, avec impact pronostique péjoratif ; implication dans tout type de leucémies lymphoïdes B et T, myéloïdes ou mixtes ; implication dans les leucémies secondaires, chez des patients préalablement traités par un inhibiteur de la topo isomérase II pour une autre forme de cancer. Enfin, bien que les gènes partenaires soient extrêmement hétérogènes, les fusions *MLL* se distinguent par leur profil d'expression spécifique différent des autres LAL et LAM, ciblant de manière quasi constante la dérégulation des gènes *HOX* (Armstrong et al., 2002; Ferrando et al., 2003).

Généralités sur le gène MLL

Le gène *MLL*, homologue humain du gène Trithorax de la drosophile, est localisé en 11q23 et possède 36 exons. Les gènes *MLL/Trx* sont nécessaires pour la maintenance des gènes *HOX*/*Hom-C* indispensables à l'organisation spatiale des vertébrés et invertébrés (Yu et al., 1995). Son rôle est essentiel dans le développement embryonnaire et l'hématopoïèse, par son action régulatrice activatrice des gènes du cluster *HOX* (Hess, 2004; Hess et al., 1997). Enfin, *MLL* est également impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Liu et al., 2007; Milne et al., 2005a).

La protéine MLL orchestre des processus biologiques essentiels, à travers son architecture de domaines qui lient l'ADN, soit directement (séquences riches en AT), soit indirectement (séquence spécifique de facteurs de transcription), lui fournissant des interfaces pour l'assemblage de complexes multi-protéiques et une activité méthylase sur la lysine 4 de

l'histone H3 (H3K4). Cette protéine possède plusieurs domaines conservés, de fonctions différentes, notamment : 3 domaines « AT hooks », en position N-terminale, qui permettent la liaison avec les régions riches en AT ; un domaine de répression transcriptionnel, consistant en une région homologue CXXC DNMT, riche en cystéine (DNA MethylTransferase1), capable de lier les ilots CpG non méthylés ; 4 domaines PHD (plant homeodomain) capables d'interactions protéine-protéine ; un domaine Bromo, capable d'interactions avec les histones ; un domaine de transactivation interagissant avec CBP/P300 ; un domaine SET, en région C-terminale, à activité histone méthyl transférase (HMT) H3K4 (***figure 5***). L'étude des multiples partenaires *MLL* a fourni de nombreuses informations sur la façon dont MLL régule l'expression de ces gènes cibles. MLL forme des complexes protéiques avec Menin (gène suppresseur de tumeur), des régulateurs cellulaires (E2Fs et HCF-1), des protéines Pc-G (BMI-1 et HPC3), des histones désacétylases (HDACs), les histones acétyltransférases (CBP et MOF) et des facteurs remaniant la chromatine (INI1/SNF5) (Liu et al., 2009). La protéine MLL subit une maturation dans le cytoplasme, par clivage, en un fragment amino-terminal (MLL-N) et un fragment carboxy-terminal (MLL-C), qui sont non associés de manière covalente, mais sont capables d'hétérodimérisation.

Réarrangements MLL

Les réarrangements chromosomiques impliquant le gène *MLL* incluent des translocations équilibrées ou déséquilibrées, des inversions, des délétions et une duplication partielle en tandem (Hess, 2004). Actuellement, *MLL* est remanié avec 104 partenaires chromosomiques, dont 64 ont été caractérisés au plan moléculaire (Meyer et al., 2009). Les remaniements chromosomiques impliquant *MLL* sont retrouvés chez 5-6% des LAM, 7-10% des LAL, 60-70% des leucémies aigües de l'enfant de moins de 1 an, et dans des formes secondaires de LAL et LAM. Les translocations les plus communes sont les t(4 ;11) et t(11 ;19), générant respectivement la fusion *MLL-AF4* et *MLL-ENL* dans les leucémies aigües lymphoblastiques ou mixtes, et les t(9 ;11) et t(6 ;11) donnant respectivement les fusions *MLL-AF9* et *MLL-AF6* dans les leucémies aigües myéloblastiques (Jansen et al., 2007).

La plupart des réarrangements de *MLL* sont situés dans une région de 8,3 kb et aboutissent à la production d'une protéine chimérique, qui fusionne la partie N-terminale de *MLL* avec la portion C-terminale du gène partenaire (Harper and Aplan, 2008). Toutes les protéines de fusion *MLL* conservent les 3 domaines « AT hooks » et le domaine « CxxC Zinc-finger domain». Par contre, les domaines PHD, le domaine d'activation transcriptionnel

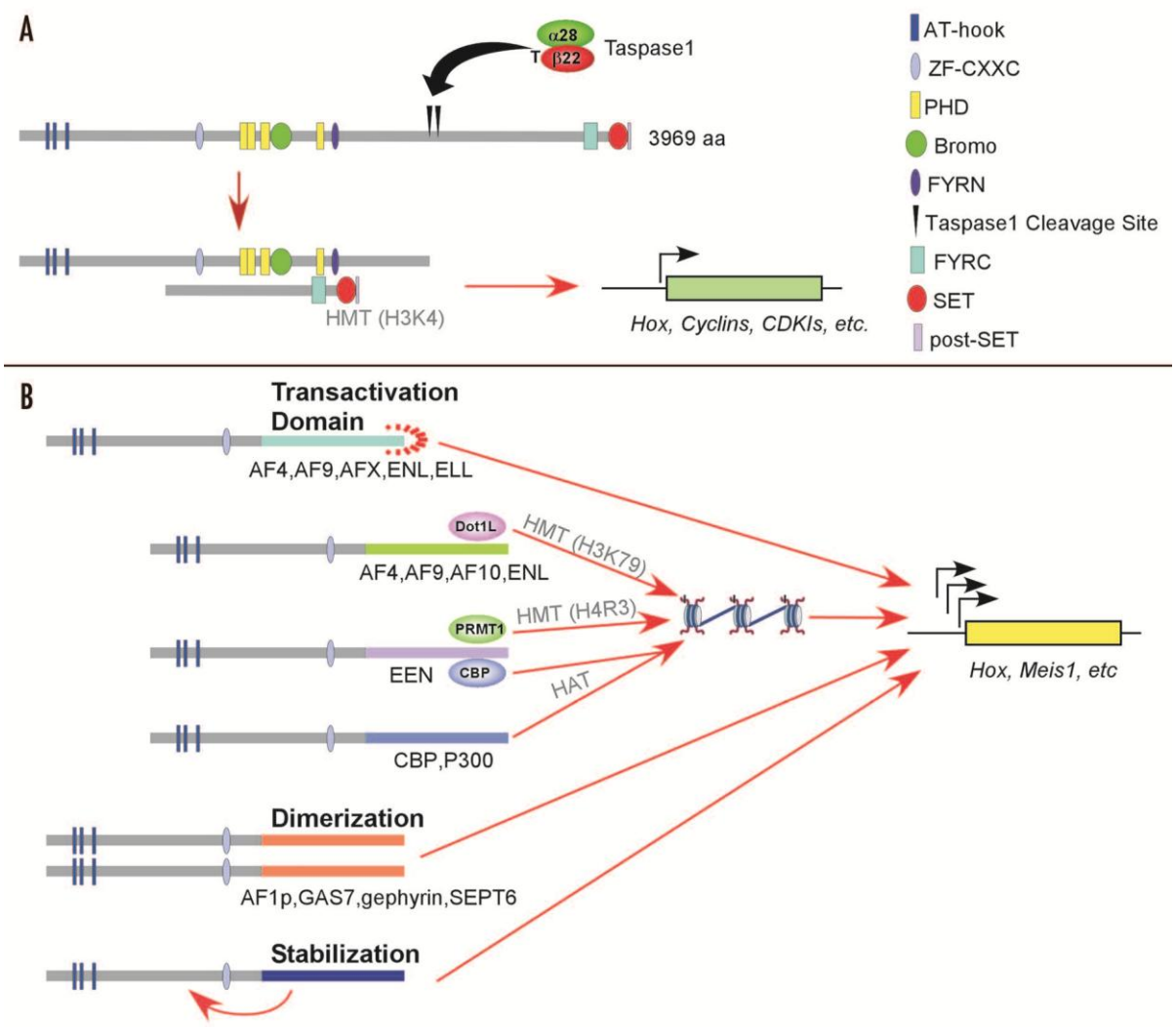


Figure 5. (A) Structure de la protéine (B) Mécanismes de transactivation des gènes cibles par les fusions *MLL*.

capable de recruter CPB et le domaine suppresseur SET (suppressor variegation-enhancer of zeste-trithorax), qui module la méthylation H3K4, sont perdus. Bien que la partie C-terminale de MLL soit perdue dans les protéines chimériques, les oncoprotéines chimériques fonctionnent comme des régulateurs transcriptionnels et induisent des expressions aberrantes des cibles de *MLL*, y compris des gènes *HOX* (Liedtke and Cleary, 2009).

Les fusions *MLL*, en inhibant l'extinction des gènes *Hox* et de ces co-régulateurs comme Meis1, bloqueraient ainsi la différenciation terminale.

Les partenaires de *MLL* peuvent être classés en 5 groupes. Le *groupe 1* comprend les gènes codant pour des protéines nucléaires. Le *groupe 2* comprend des gènes codant pour des

protéines cytoplasmiques possédant des domaines d'oligodimérisation coiled-coil. Le *groupe 3* comprend les gènes codant pour des protéines de la famille des septines, qui sont des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, dans le trafic intracellulaire et dans la compartimentalisation membranaire. Le *groupe 4* comprend des histones acétyltransférases. Enfin le *groupe 5*, comprend la duplication en tandem de *MLL*, qui est le seul remaniement *MLL* conservant le domaine SET de la portion C-terminale (Krivtsov and Armstrong, 2007).

Etude des modèles murins MLL-partenaires

De nombreuses modélisations chez la souris des fusions *MLL-partenaires*, ont reproduit des leucémies, montrant le caractère indispensable des fusions dans la leucémogénèse et ont permis d'identifier les cibles cellulaires des fusions (Liu et al., 2009).

Mécanismes de transactivation des HOX dans les fusions MLL- partenaires

Une caractéristique commune des leucémies avec réarrangements de *MLL* est l'expression élevée des gènes *HOX*, en particulier *HOXA4, HOXA5, HOXA7, HOXA9, HOXA10* et *HOXC6* (Armstrong et al., 2002; Ferrando et al., 2003). La transformation des progéniteurs myéloïdes *MLL-ENL* est dépendante de l'expression des gènes *HoxA7* et *HoxA9* (Ayton and Cleary, 2003). Par ailleurs, les leucémies *MLL* réarrangées sont associées à l'hyper expression de l'homéogène *Meis1*, dont l'expression est nécessaire dans les leucémies induites par *Mll-Af9* (Armstrong et al., 2002; Kumar et al., 2009). Cependant l'expression de ces deux gènes n'est pas nécessaire pour la transformation par *MLL-GAS7* suggérant que d'autres voies sont dérégulées dans le processus de transformation par les fusions *MLL* (So et al., 2004).

Trois mécanismes principaux semblent intervenir dans la dérégulation des cibles cellulaires induites par les fusions *MLL*.

Le *premier mécanisme* cible directement la dérégulation de l'initiation de la transcription de gènes cibles, comme dans les fusions avec les partenaires *AF4*, *AF9* et *ENL*, qui conservent un domaine de transactivation transcriptionnelle du partenaire (Chen et al., 2006), ou avec le gène *ELL*, qui est un facteur d'élongation de l'ARN polymérase II (Shilatifard et al., 1996).

Le *deuxième mécanisme* est l'activation indirecte de gènes cibles, par des modifications épigénétiques de séquences d'ADN promotrices.

Le gène *MLL* possède un domaine SET à activité HMT H3K4, qui est conservé dans la fusion *MLL*-PTD. L'étude du modèle murin *Mll*-PTD montre que la fusion facilite la triméthylation des histones H3K4 et l'acétylation H3 et H4 des promoteurs de Hoxa7, Hoxa9 et Hoxa10, probablement par l'intermédiaire d'une dérégulation de CBP et p300 au locus des *Hox* (Dorrance et al., 2006). Dans les autres fusions *MLL*, le domaine SET n'est pas conservé, mais des modifications épigénétiques par d'autres cibles que l'activité H3K4 ont été décrites. Ainsi, les partenaires *CPB* et *p300*, qui sont des HAT, peuvent-ils générer de par leurs propriétés des modifications épigénétiques de gènes cibles. Les fusions *MLL* avec *AF4*, *AF5*, *AF10* et *ENL* recrutent DOT1L, une H3K79 méthyl transférase, et forment un complexe qui induit la méthylation H3K79 sur le promoteur d'*HoxA9*, augmentant sa transcription (Milne et al., 2005b; Mueller et al., 2007; Okada et al., 2005). Enfin, la protéine arginine méthyl transférase 1 (PRMT1) a récemment été impliquée dans le mécanisme oncogénétique de la fusion *MLL-ENL*. PRMT1 est un important régulateur transcriptionnel épigénétique, qui maintient la transcription active de la chromatine, par son activité méthylase de l'arginine 3 de l'histone 4 (H4R3). Cette protéine est recrutée par la fusion MLL-EEN, au sein d'un complexe, provoquant la méthylation H4R3 du promoteur d'*HOXA9*, ainsi qu'une activité histone acétylase par le recrutement de CPB/p300 (Cheung et al., 2007).

Le *troisième mécanisme* est lié à la capacité d'homodimérisation de certaines fusions *MLL-partenaires*. Ce concept a été introduit par l'étude de la fusion *Mll* (8 premiers exons) à la β-galactosidase, protéine connue pour s'oligo-dimériser. La fusion *Mll-lacZ* a conduit de manière surprenante à la survenue de LAM chez la souris, avec une latence de survenue plus retardée comparativement au modèle *Mll-Af9* (Dobson et al., 2000). La protéine LacZ en provoquant une dimérisation, des protéines chimériques Mll-LacZ, stabiliserait ainsi une protéine multi-dimérique possédant la partie tronquée N-terminale de Mll, pouvant ainsi déréguler des cibles de *Mll*. L'étude expérimentale murine, des fusions *MLL-GAS7* et *MLL-EPS15*, a montré que leur potentiel oncogénique était dépendant de leurs domaines coiled-coil, et de leur capacité d'homodimérisation. L'étude de l'expression des *Hox* dans ces deux fusions montre une activation comparable à la fusion *MLL-ENL* des *Hoxa5, Hoxa7, Hox9, Hoxa10* et de leurs cofacteurs *Meis1* et *Meis3* (Ono et al., 2005; So et al., 2003b). Ces résultats suggèrent que les fusions *MLL* avec un partenaire cytoplasmique, capable de dimérisation, a le même effet que les oncoprotéines MLL directement transactivatrices du locus *Hox*, en recrutant d'autres cofacteurs transcriptionnels par l'intermédiaire de leur « moitié partenaire ».

Deux gènes essentiels sont nécessaires au processus de transformations leucémiques. **Menin** est une des multiples protéines du complexe MLL HMT. Ce gène suppresseur de tumeur, initialement décrit pour son implication dans les néoplasies endocriniennes malignes héréditaires de type I, interagit avec la partie N-terminale de MLL. De la même manière que la perte d'expression de MLL, l'inhibition de l'expression de *Menin* entraine la perte de l'expression des *HOX* (Yokoyama et al., 2005). Menin et MLL régulent conjointement les CDKI (Cyclin-Dependant Kinase Inhibitors) p27Kip1 et p18Ink4c, ainsi que Meis1, cofacteur des HOX (Milne et al., 2005a). Menin est nécessaire à l'activité oncogénique des leucémies induites par les fusions MLL (Yokoyama et al., 2005). Par ailleurs, Menin est un adaptateur liant MLL avec LEDGF (Lens Epithelium-Derived Growth Factor). **LEDGF** est une protéine liée à la chromatine. Elle est indispensable pour la régulation transcriptionnelle MLL dépendante et pour la transformation leucémique (Ahuja et al., 2000b; Yokoyama and Cleary, 2008).

Autres cibles cellulaires de fusions MLL-partenaires.

D'autres voies de signalisation sont impliquées dans les mécanismes de leucémogénèse MLL. En particulier, une hyperexpression de FLT3, résultant de mutations activatrices, est fréquemment observée dans les leucémies MLL réarrangées (Armstrong et al., 2002).

Les fusions MLL induisent des propriétés de cellules souches

L'étude, dans le modèle murin, de la fusion MLL-ENL a démontré que les cellules leucémiques pouvaient être induites non seulement par les cellules souches hématopoïétiques, mais également par des progéniteurs communs engagés, les GMP, dont les formes non transformées n'ont pas la propriété d'autorenouvellement (Cozzio et al., 2003). Cette capacité est partagée par la fusion MOZ-TIF2, qui fusionne l'acétyltransférase MOZ avec un récepteur nucléaire coactivateur TIF2. L'effet leucémogène de cette fusion semble influencé par des modifications chromatiniennes à travers l'interaction avec CBP. A l'opposé, les GMP ne sont pas transformées par la fusion BCR-ABL (Huntly et al., 2004). L'expression de la fusion MLL-AF9, dans des GMP de souris, induit la transformation des GMP en CSL, qui sont transplantables dans des receveurs secondaires. L'étude comparative du profil d'expression transcriptionnelle montre l'acquisition par les CSL transformées d'un set de gènes, habituellement exprimés dans les CSH, comprenant *Hox9, Hoxa10, Meis 1* et *Mef2c*, tout en conservant un profil transcriptionnel des GMP dont elles sont issues. Ceci suggère que les

protéines de fusion MLL sont capables de reprogrammer un progéniteur engagé, non pas par dédifférenciation, mais en acquérant des propriétés de cellules souches, par l'expression de gènes impliqués dans la maintenance des CSH (Krivtsov et al., 2006).

En résumé, l'étude des leucémies associées aux fusions MLL a permis de mettre en évidence l'impact des mécanismes épigénétiques dans la survenue des leucémies. Il a démontré également l'importance de la régulation des gènes homéotiques, dans la survenue des hémopathies malignes.

D. Le gène *NUP98*

L'idée d'étudier les remaniements du gène *NUP98* dans les hémopathies malignes procède du même raisonnement. *NUP98* étant un gène à multipartenaires, l'étude moléculaire et fonctionnelle des fusions *NUP98* dans les hémopathies malignes devrait nous permettre de décrire une ou plusieurs voies moléculaires majeures de la leucémogénèse. Par ailleurs, *NUP98* n'ayant aucun rôle spécifique dans l'hématopoïèse (à la différence des autres gènes à multipartenaires), la caractérisation des fusions *NUP98* devrait nous servir de fil d'Ariane pour la découverte de nouveaux gènes importants dans l'hématopoïèse. Avant d'aborder les résultats de notre travail, nous ferons une présentation générale de *NUP98*, du rôle de son produit protéique dans le pore nucléaire, ainsi qu'un rapide résumé des gènes partenaires connus au commencement de notre étude.

NUP98 est un gène ubiquitaire qui code une nucléoporine de 98 kDa, NUP98, qui n'a pas de rôle spécifique dans l'hématopoïèse. Elle fait partie des nucléoporines, qui sont des protéines constituant le complexe du pore nucléaire (CPN), et situées dans les pores nucléaires.

1. Le complexe de pore nucléaire

a) Rappels

Le CPN est une super structure multi-protéique, qui assure le trafic bidirectionnel des protéines et des ARN entre le cytosol et le noyau. Le CPN est composé d'une trentaine de protéines différentes, appelées nucléoporines (Nups), auxquelles appartient NUP98. Il est orienté dans la membrane nucléaire. La plupart des protéines ayant une fonction dans le noyau sont sélectivement importées du cytosol. Les ARNt et ARNm, qui ont été synthétisés dans le noyau, sont eux exportés vers le cytosol. Ces processus sont sélectifs au travers de la membrane nucléaire via le CPN.

Ce système de transport sélectif repose sur 4 éléments principaux : un signal cargo, NLS (nuclear localisation signal) pour l'importation, un signal NES (nuclear exportation signal) pour l'exportation, localisé sur les protéines; un récepteur de transport nucléaire NTR (nuclar transport receptor), représenté par les karyophérines, importines ou exportines, qui reconnaissent le signal ; des nucléoporines, riches en répétitions FG, qui forment un filet dans le CPN, qui est perméable uniquement aux complexes cargos karyopherines/NTRs ; le

système de protéines RanGTP, sur la face nucléaire du CPN, pour désassembler les complexes importés et assembler les complexes d'exportation (voir pour revue (Xylourgidis and Fornerod, 2009)).

Les CPN jouent un rôle dans le contrôle de la transcription. Il a été démontré chez *Saccharomyces cerevisiae*, que les gènes localisés près des CPN étaient hautement transcrits, suggérant que le CPN pourrait activer la transcription en relocalisant la chromatine vers la périphérie du noyau (Brown and Silver, 2007; Casolari et al., 2004). Chez les eucaryotes, une étude récente de chromatime immunoprécipitation, couplée à une analyse génomique (ChIP-chip), effectuée par Vaqueriaz et al, chez *Drosophilia megalogaster*, a démontré que deux nucléoporines Nup153 et Megator (Mtor) étaient associées à d'importants domaines génomiques de 10 à 500 kb. Ces régions, appelées Nucleoporin Associated Regions (NARs), contiennent des gènes hautement transcrits, et sont riches en ARN polymerase II et en histone H4 lysine 16 acetylase, connue pour relâcher la chromatine *in vitro*. Pour montrer que l'activation des gènes était directement liée aux nucléoporines, et écarter l'hypothèse d'une simple localisation des gènes actifs à proximité du CPN, ces auteurs ont démontré que la déplétion de Nup153, par ARN interférence, s'accompagnait d'une forte réduction de l'activité de milliers de gènes, notamment au sein des NARs. Ils démontrent également que ces deux protéines participent activement à l'hyperexpression compensatrice des gènes du chromosome X chez les mâles, et qu'indépendamment de leur localisation à proximité des CPN, les nucléoporines Nup153 et Mtor peuvent naviguer dans le noyau, au sein des NARs, et moduler l'expression des gènes dans le noyau. Cette étude suggère, que la liaison de nucléoporines au sein des NARs, est impliquée dans l'organisation spatiale nucléaire, liée au contrôle de l'expression génique (Ikegami and Lieb, 2010 ; Vaquerizas et al., 2010).

b) Le CPN en pathologie humaine

Compte tenu du rôle fondamental des composants du CPN dans la physiologie cellulaire, il n'est pas étonnant qu'ils soient impliqués en pathologie constitutionnelle ou acquise.

En pathologie constitutionnelle, des délétions de *NUP93* ont ainsi été associées à des fibrillations auriculaires responsables de mort subite chez l'enfant (Zhang et al., 2008). En pathologie acquise, différents remaniements chromosomiques conduisent à la fusion oncogénique de gènes codant pour des nucléoporines. Outre ceux ciblant *NUP98*, la nucléoporine *NUP214* est fusionnée à l'oncogène *ABL* dans un épisome retrouvé chez près de

7 % des LAL de la lignée T et à *DEK* par la translocation récurrente t(6;9)(p23;q34), toujours dans les LAL de la lignée T (Ageberg et al., 2008; Graux et al., 2004).

c) NUP98 dans le CPN

NUP98 est situé à 3,5 Mb du télomère en 11p15.4. Il s'étend sur 122 kb et comprend 33 exons. *NUP98* est exprimé de façon ubiquitaire et ses deux transcrits principaux de 7 kb et de 4 kb codent pour des protéines de 186 kDa et de 98 kDa respectivement (Lam and Aplan, 2001). Ces deux précurseurs protéiques sont clivés au niveau de la même séquence peptidique, générant les produits NUP98 et NUP96 pour l'un, et NUP98 et un polypeptide de 8 kDa pour l'autre (***Figure 6***).

NUP96 appartient au complexe NUP160 (constitué de NUP160, 133, 107 et 96), qui est une structure fixe, présente sur les deux faces de la membrane nucléaire.

NUP98 est une protéine de transport itinérante, située essentiellement sur la face nucléaire du CPN, qui peut naviguer à la fois dans le noyau, et entre le noyau et le cytoplasme. NUP98 est la seule nucléoporine à posséder dans sa partie N-terminale, 37 domaines GLFG (glycine-leucine-phénylalanine-glycine), sur lesquelles se fixent les karyophorines (famille protéique de transporteurs nucléaires). Il possède également un domaine GLEBS de fixation pour Gle2, protéine spécialisée dans le transport des ARNm chez *S. cerevisiae*, et pour son homologue RAE1, chez les mammifères (Pritchard et al., 1999) (***Figure 6***).

Dans sa partie C-terminale, il possède un domaine à activité auto-protéolytique, qui semble nécessaire pour diriger NUP98 dans le CPN, et un domaine de liaison aux ribonucléoprotéines. Cette partie C-terminale semble également jouer le rôle de signal de localisation nucléaire (Fontoura et al., 2001).

NUP98 est associée de façon dynamique au pore nucléaire (fixation au complexe NUP88/NUP214 au niveau de la partie cytoplasmique du CPN, et au complexe NUP160 au niveau de la partie nucléaire du CPN), ainsi qu'à des corps nucléaires, et assure de façon dynamique, le transport principalement des d'ARN messagers et ribosomaux, mais peu le transport des protéines, ainsi que plusieurs virus à ADN, entre le noyau et le cytoplasme (Dokudovskaya et al., 2002; Griffis et al., 2002; Griffis et al., 2003; Hodel et al., 2002; Powers et al., 1997). Durant la transcription, la protéine NUP98 est localisée dans des corps nucléaires GLFG, dont le rôle n'est pas établi (Griffis et al., 2002).

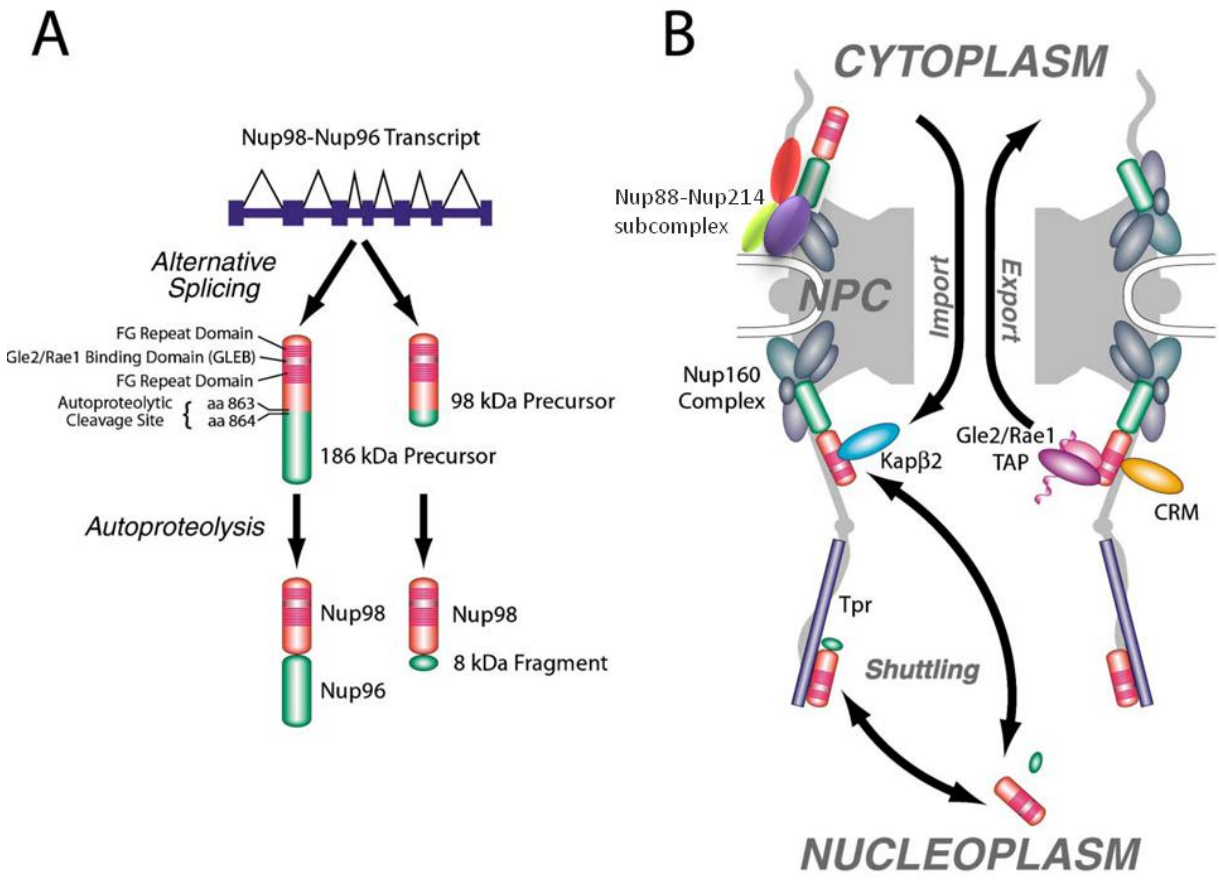


Figure 6 : Nup98 (modifiée d'après (Dokudovskaya et al., 2002)).

A : Epissage alternatif du gène *Nup98* produisant deux transcrits alternatifs, conduisant à la production de Nup98, Nup96 et un fragment de 8kDa. **B** : Nup96 est un élément du complexe Nup160 et du complexe Nup88-Nup214, qui peut lier Nup98, respectivement, sur les faces nucléaire et cytoplasmique du CPN. Les protéines d'import Kapβ2 et d'export CRM lient les domaines répétés FG de Nup98 et la protéine TAP *(Tip associated protein)*, facteur d'export d'ARNm. Gle2/Rae1 lient Nup98 par un site dédié. Nup98 peut également naviguer indépendamment de Nup96 dans le noyau. *NPC : nuclear pore complexe.*

NUP98 intervient également dans le contrôle de la transcription, par l'intermédiaire de ces répétitions GLFG, qui sont capables d'interagir avec les histones acétyltransférases CBP et p300 (Kasper et al., 1999).

Dans le noyau, NUP98 et RAE1 interviennent dans le contrôle du « checkpoint » mitotique, en participant à la régulation du complexe APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome)-Cdh1-securin, qui maintient l'euploïdie durant la mitose. Le complexe APC/C cible la sécurine, qui est un inhibiteur de l'anaphase. Il a été démontré dans des expériences de transgénèse murine, que les facteurs Nup98 et RAE1 s'associent au complexe APC/C^{cdh1}-sécurine, pour prévenir la dégradation prématurée de la sécurine. Dans la

métaphase tardive, lorsque les chromosomes sont correctement alignés, que le point de contrôle du fuseau est satisfait, Nup98 et RAE1 sont libérés du complexe, permettant l'ubiquination de la sécurine et l'entrée en anaphase (Baker et al., 2007; Jeganathan et al., 2006; Jeganathan et al., 2005; Rao et al., 2009). Enfin, Nup98 est indispensable dans le développement embryonnaire. L'extinction de Nup98, par KO chez la souris, aboutit au décès prématuré des embryons. Les cellules ne semblent pas avoir d'anomalie majeure du CPN, mais les CPN présentent une capacité réduite à lier les karyophorines (Wu et al., 2001).

2. *NUP98* dans les hémopathies malignes

Le gène *NUP98* a été identifié dans les hémopathies malignes, lors de la caractérisation moléculaire de la translocation t(7;11)(p15;p15.4), fusionnant *NUP98* et *HOXA9*, retrouvées chez des patients atteints de leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) (Borrow et al., 1996; Nakamura et al., 1996). Depuis, de multiples remaniements du gène *NUP98* ont été décrits dans les hémopathies malignes, faisant de *NUP98* est un gène multipartenaires.

En 2006, on savait que depuis sa mise en évidence dans la translocation t(7;11) en 1996 (Borrow *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1996), 17 partenaires de NUP98 avaient été identifiés. Plus de la moitié de ces gènes étaient des gènes codant pour des facteurs de transcription à homéoboite, dont les gènes homéotiques *HOXA9*, *HOXA11* ou *HOXA13* (7p15) (Borrow et al., 1996; Fujino et al., 2002; Nakamura et al., 1996; Taketani et al., 2002a), *HOXC11* et *HOXC13* (12q13) (Gu et al., 2003; Taketani et al., 2002c) (La Starza *et al.*, 2003; Panagopoulos *et al.*, 2003), *HOXD11* et, *HOXD13* (2q31) (Arai et al., 2000; Raza-Egilmez et al., 1998; Shimada et al., 2000; Taketani et al., 2002b), les gènes *PMX1* (1q23) (Nakamura *et al.*, 1999) et *PMX2* (9q34) (Gervais *et al.*, 2005). Parmi les autres gènes partenaires de NUP98, on trouvait les gènes codant pour des protéines à localisation nucléaires tels que : l'hélicase *DDX10* (11q22) (Arai *et al.*, 1997), la Topoisomérase 1 (TOP1) (20q11) (Ahuja et al., 1999; Chen et al., 2003; Iwase et al., 2003; Panagopoulos et al., 2002; Potenza et al., 2004), les NR-binding Set-Domain protein : NSD1 (5q35) (Brown et al., 2002; Jaju et al., 2001; Panarello et al., 2002) et NSD3 (8p11) (Rosati *et al.*, 2002), qui sont des cofacteurs des récepteurs nucléaires (NR), possédant en plus un domaine SET (domaine H3 méthyltransférase) et 5 motifs en doigts de zinc PHD (Plant Homeo Domain) ; et pour le facteur de transcription *LEDGF/p52* (9p22) (Ahuja et al., 2000b; Hussey et al., 2001; Morerio et al., 2005). Enfin, NUP98 avait été décrit également recombiné à des gènes codant pour des

protéines cytoplasmiques : *Adducin3* (10q25) (Lahortiga *et al.*, 2003) et *RAP1GDS1* (4q21) (Hussey *et al.*, 1999).

D'un point de vue fonctionnel, seules les fusions *Nup98-homéogènes*, en particulier *Nup98-Hox9* avaient été étudiées. Il avait été démontré, dans des modèles murins, que le pouvoir oncogénique des « Nup98-Protéines à domaine Homéodomaine » était liée à leur fixation sur le promoteur de HoxA9 par l'homéodomaine et à celle des protéines acétyl-tranférases CBP et p300 fixées sur la partie FG de la protéine chimérique. La présence de ces protéines entraînait une acétylation du locus d'Hoxa9, permettant alors le maintien de la chromatine de ce dernier, en conformation ouverte, générant l'expression dérégulée du gène *Hoxa9*.

III. RÉSULTATS

Mon travail a consisté en la participation à l'étude clinico-biologique du GFCH (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique), à la caractérisation cytogénétique d'un remaniement complexe aboutissant à la fusion *NUP98-NSD1* et à l'étude moléculaire et fonctionnelle de deux nouvelles fusions impliquant le gène *NUP98*.

Je présenterai dans un premier temps, les résultats de l'étude du GFCH actualisés sur la base des articles parus dans la littérature depuis 2006, ainsi que l'étude cytogénétique du remaniement complexe 46,XY,add(5)(q35),del(9)(q22q32),del(11)(p13). Dans un deuxième temps, j'exposerai les résultats des études moléculaires et fonctionnelles, impliquant les fusions *NUP98-HMGB3* et *NUP98-CCDC28A*.

Enfin, je discuterai les hypothèses sur les voies oncogéniques empruntées par ces deux fusions à la lumière des connaissances actuelles qu'ont apportées les modèles murins de fusions *NUP98*.

A. Article 1

NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies: a study of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique.

Romana SP, Radford-Weiss I, Ben Abdelali R, Schluth C, Petit A, Dastugue N, Talmant P, Bilhou-Nabera C, Mugneret F, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Andrieu J, Lai JL, Terre C, Rack K, Cornillet-Lefebvre P, Luquet I, Nadal N, Nguyen-Khac F, Perot C, Van den Akker J, Fert-Ferrer S, Cabrol C, Charrin C, Tigaud I, Poirel H, Vekemans M, Bernard OA, Berger R; Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. Leukemia. 2006 Apr;20(4):696-706

Les réarrangements de *NUP98* sont classiquement associés à un facteur de pronostic défavorable. Depuis la caractérisation de la 1ère fusion *NUP98-HOXA9*, plusieurs réarrangements avec d'autres partenaires ont été décrits.

L'étude collaborative du GFCH a permis, à partir de l'examen par FISH de 66 patients atteints d'hémopathies malignes diverses, associées à un remaniement de la bande 11p15, de détecter 23 remaniements du gène *NUP98*. Une étude de la littérature, portant sur 73 cas de remaniement *NUP98*, a permis une analyse clinico-biologique des fusions *NUP98*.

Cette étude montre que 35% (22 des 66 patients explorés) des patients traités pour une hémopathie maligne, dont le caryotype montre un réarrangement 11p15, ont un réarrangement du gène *NUP98*. Les remaniements *NUP98* seraient de 1 à 2% dans les hémopathies malignes.

Elle rapporte les nouvelles fusions *NUP98* avec les gènes *LNP1*, *C6orf80* (*CCDC28)* et *HMGB3*.

Cette étude apporte par ailleurs, quelques points sur l'épidémiologie des hémopathies malignes avec réarrangement de *NUP98*. Les premières caractérisations ont été établies par des équipes asiatiques, laissant penser que ce gène était plus fréquemment remanié dans cette population. Les résultats de la revue des cas publiés montrent que cette anomalie affecte aussi bien les Caucasiens, que les Asiatiques. Sur le plan cytogénétique, l'ensemble des caryotypes associés aux hémopathies avec réarrangement de *NUP98* sont simples (moins de trois anomalies chromosomiques). Les hémopathies malignes impliquées sont réparties de la manière suivante : les ¾ sont des hémopathies de novo et ¼ sont des leucémies ou myélodysplasies secondaires à une chimiothérapie ; les LAM de novo sont essentiellement représentées par les types M2 (60%) et M4 (20%) ; les SMD représentent 8% des patients (4% de novo, 4% secondaires) ; les LAL-T représentent 12% des patients ; aucun patient ne présente une leucémie de la lignée B.

Enfin, une classification basée sur la corrélation entre le type d'hémopathies malignes et le type de fusion est proposée. Le *groupe 1* comporte les gènes *HOX* et *NSD*, essentiellement impliqués dans des hémopathies myéloïdes de novo. Le *groupe 2* comprend les gènes *TOP1/TOP2/DDX10*, qui représentent 25% des réarrangements *NUP98* et sont essentiellement retrouvés dans les hémopathies myéloïdes secondaires, avec une prédominance féminine pour les réarrangements avec *TOP1*. Le *groupe 3* contient *RAP1GDS*, impliqué dans LAL-T, représentant 9% des cas de cette série, dont 50% des patients ont moins de 20 ans. À eux seuls, les groupes 1 à 3 représentent 86% des fusions *NUP98*. Les gènes *LEDGF*, *ADD3* et *C6orf80(CCDCA28)* n'entrent pas dans l'un de ces groupes et représentent 14% des cas.

Leukemia (2006), 1–11
© 2006 Nature Publishing Group All rights reserved 0887-6924/06 $30.00
www.nature.com/leu

ORIGINAL ARTICLE

NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies: a study of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique

SP Romana[1,2], I Radford-Weiss[1,2], R Ben Abdelali[2], C Schluth[2], A Petit[2], N Dastugue[3], P Talmant[4], C Bilhou-Nabera[5], F Mugneret[6], M Lafage-Pochitaloff[7], M-J Mozziconacci[7], J Andrieu[8], J-L Lai[8], C Terre[9], K Rack[10], P Cornillet-Lefebvre[11], I Luquet[11], N Nadal[12], F Nguyen-Khac[13], C Perot[14], J Van den Akker[14], S Fert-Ferrer[15], C Cabrol[16], C Charrin[17], I Tigaud[17], H Poirel[18], M Vekemans[1], OA Bernard[2], R Berger[2], and on behalf of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH)

[1]Service de cytogénétique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Necker-Enfants Malades, Paris, France; [2]INSERM EMI 0210, CHU Necker-Enfants Malades, Paris, France; [3]CHU Toulouse, Toulouse, France; [4]CHU Nantes, Nantes, France; [5]Hôpital Haut Lévêque, Bordeaux, France; [6]CHU Dijon, Dijon, France; [7]Institut Paoli Calmettes, Marseille, France; [8]Hôpital Jeanne de Flandre, Lille, France; [9]Centre Hospitalier de Versailles, Versailles, France; [10]Institut de Pathologie et de Génétique, Gerpinnes, Belgium; [11]CHU Reims, Reims, France; [12]CHU Hôpital Nord, St Etienne, France; [13]Groupe Hospitalier Pitié-Salpétrière, Paris, France; [14]CHU St Antoine, Paris, France; [15]CHR Chambéry, France; [16]Hôpital Universitaire de Genève, Switzerland; [17]Hôpital E.Herriot, Lyon, France and [18]Cliniques Universitaires, Saint Luc, UCL GMED, Bruxelles, Belgium

The *NUP98* gene is fused with 19 different partner genes in various human hematopoietic malignancies. In order to gain additional clinico-hematological data and to identify new partners of *NUP98*, the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH) collected cases of hematological malignancies where a 11p15 rearrangement was detected. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis showed that 35% of these patients (23/66) carried a rearrangement of the *NUP98* locus. Genes of the *HOXA* cluster and the nuclear-receptor set domain (*NSD*) genes were frequently fused to *NUP98*, mainly in *de novo* myeloid malignancies whereas the *DDX10* and *TOP1* genes were equally rearranged in *de novo* and in therapy-related myeloid proliferations. Involvement of *ADD3* and *C6ORF80* genes were detected, respectively, in myeloid disorders and in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), whereas the *RAP1GDS1* gene was fused to *NUP98* in T-ALL. Three new chromosomal breakpoints: 3q22.1, 7p15 (in a localization distinct from the *HOXA* locus) and Xq28 were detected in rearrangements with the *NUP98* gene locus. The present study as well as a review of the 73 cases previously reported in the literature allowed us to delineate some chromosomal, clinical and molecular features of patients carrying a *NUP98* gene rearrangements.
Leukemia advance online publication, 9 February 2006;
doi:10.1038/sj.leu.2404130
Keywords: leukemia; chromosome 11p15; NUP98; FISH

Introduction

The first rearrangement of the *NUP98* gene in hematopoietic malignancy was reported in 1996 by Nakamura *et al.* and Borrow *et al.* in a study of the rare but recurrent translocation t(7;11)(p15;p15),[1,2] Subsequently, it was shown that *NUP98*, like *MLL*, *ETV6* and *RUNX1*, is the target of rare and various chromosomal rearrangements associated with childhood and adult *de novo* and therapy related, myeloid and lymphoblastic T-cell acute leukemias. Until now, *NUP98* has been found rearranged with 19 different partner genes resulting in in-frame fusion genes subclassified into three groups. The first group is composed of nine genes coding for homeodomain proteins, seven homeotic genes (*HOXA9, HOXA11, HOXA13, HOXC11, HOXC13, HOXD11* and *HOXD13*),[3–5] and two class-2 homeobox genes (*PRRX1* and *PRRX2*).[6,7] The second group comprises eight nuclear nonhomeotic genes: the lens epithelium-derived growth factor (*LEDGF*),[8–11] the nuclear-receptor binding set domain genes (*NSD1*),[12–16] and *NSD3*,[17] the helicase *DDX10*,[18–21] the topoisomerase *TOP1*,[22–26] and *TOP2B* genes,[27] the *FN1* gene[28] and the *C6orf80* gene.[29] The third group is composed of two genes, respectively, *RAP1GDS1*[30,31] and *ADD3*[32] encoding two cytoplamic proteins and fused to *NUP98* in T-ALLs.

The *NUP98* gene, maps to chromosome 11p15.4, is 122 kb long and is located 3.6 Mb from the telomere on the short arm of chromosome 11. It is composed of 33 exons and codes for a Nup98–Nup96 precursor of 1729 amino acids, which after cleavage generates the Nup98 protein (860 amino-acids coded by the 18 first *NUP98* exons) and Nup96 protein (849 amino-acids coded by the last 15 exons). Both belong to the nucleopore complex (NPC). Nup98 is dynamically associated with NPC and shuttles between the nucleus and the cytoplasm transporting protein and RNA through its N-terminal 524 amino acid part containing 37 FG and GLFG repeats and a Gle2 site that allows karyophorins and RNA transporting protein binding.[33–35]

All *NUP98* disruptions, which have been studied at the molecular level, generate a *NUP98*-partner gene fusion transcript whereas the reciprocal transcript, partner/*NUP98*, is not always present. Thereby, it is the *NUP98*/partner gene, situated on the derivative chromosome 11, that codes for the oncogenic hybrid protein. All *NUP98* gene breakpoints are located between introns 8 and 16. The hybrid protein always contains the Nup98 N-terminal GLFG domain fused to some domain of the partner protein and, the expression of the fusion gene is dependent on the 5′ regulatory NUP98 expression region. Kasper *et al.* demonstrated that the GFLG domain, in the Nup98-Hoxa9, was essential for the leukemic process because of its ability to recruit coactivators such as Cbp/p300.[36] In the same experiment, they also demonstrated the importance of the homeodomain of Hoxa9 in the cell transforming ability. If homeoproteins are clearly implicated in hematopoiesis, the role

Correspondence: Dr SP Romana, INSERM EMI 0210 and Cytogenetics Department, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, 75015, Paris, France.
E-mail: serge.romana@nck.ap-hop-paris.fr
Received 4 November 2005; revised 15 December 2005; accepted 19 December 2005

of the other partner genes in hematopoiesis is not known. The study of their function as well as the description of new *NUP98* partner genes will help in the understanding of hematopoietic and leukemic pathways.

In order to find new partners genes of *NUP98*, the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH) decided to screen 66 patients with various hematopoietic malignancies and a 11p15 rearrangement. Twenty-three (35%) of these patients exhibited chromosomal abnormalities involving *NUP98*. Three new chromosomal breakpoints were detected in chromosomal bands rearranged with the *NUP98* locus. Moreover, an analysis of our results as well as those published in the literature allowed us to further delineate some chromosomal, clinical and molecular features of patients carrying a *NUP98* gene rearrangements.

Materials and methods

Patients

Karyotypes of 71 patients with various hematological malignancies associated with a 11p15 chromosomal anomaly were reviewed during two workshops by the members of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. Only 66 patients with a chromosomal pellet were selected for FISH screening to detect a *NUP98* disruption: 41 had a *de novo* myeloid disorder, 10 had received therapy and developed a treatment-related acute myeloid leukemia (t-AML) or myelodysplastic syndrome (t-MDS), five had a T-cell malignancy (four T-ALL, one Sézary syndrome), eight developed a B-cell neoplasm (three B-ALL, two chronic lymphocytic leukemias, two diffuse large B-cell lymphoma, one multiple myeloma), one had a biphenotypic leukemia and one had an unclassifiable acute leukemia. In the group of *de novo* myeloid malignancies, five had a chronic myeloproliferative disorder (two chronic myelogenous leukemias, one essential thrombocythemia, two Ph-negative chronic myeloproliferative disorders), five had a myelodysplastic syndrome and 31 AML: six AML with multilineage dysplasia, two minimally differentiated AML (AML-M0 according to the French-American-British FAB Classification), five AML without maturation (AML-M1), four AML with maturation (AML-M2), seven acute myelomonocytic leukemias (AML-M4), six acute monocytic leukemias (AML-M5), one acute erythroid leukemia (AML-M6), Patients'general data and history can be obtained upon request to serge.romana@nck.aphp.fr.

Fish studies

For detection of *NUP98* rearrangements, dual color FISH experiments were performed with a '*NUP98* probe' composed of two contiguous BAC clones: RP11-120E20, labeled with Rhodamine-dUTP and RP11-258P13, labeled with FITC-dUTP (see Figure 1a).

Dual color FISH experiments were performed to characterize the *NUP98* fusion partners. For this purpose, we designed BAC and PAC clones spanning loci of the *NUP98* partners on the basis of the karyotype and the results of the *NUP98* rearrangement FISH screening. For the *HOXA* complex, we used three PAC clones (RP1-170O19 (AC004080), RP5-1200I23 (AC004996) and RP5-1103I5 (AC004009)) spanning the *HOXA3* to the *HOXA13* loci. For all the other gene loci, we chose one or two BAC clones covering the entire gene loci (http://genome.ucsc.edu/): RP11-486H4 and RP11-724M22 for *RAP1GDS1* gene, RP11-801G16 and RP11-700F9 for *DDX10* gene, RP11-350N15 and 675F6 for *NSD1*, RP11-333B24 for *NSD3*, RP11-111H12 and 126O24 for *TOP1*, RP11-641C1 and RP11-702L24 for *ADD3,* RP11-206H24 for *PRRX2* and RP11-900M13 for *C6orf80*. The BAC RP11-479B17 was used as probe for the telomeric Xqtel. BAC DNA was extracted with QIAfilter Plamid Maxi-Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions and labeled by nick translation with spectrum orange and spectrum green dUTP (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA). Hybridization was performed as described previously.[37] The images were captured by a Sensys camera (Photometrics Ltd, Tucson, AZ, USA) and processed with a QFISH software (Leica).

RT–PCR analysis

For patients nos. 1, 2, 3, 12, 13, 15, 19, 61 and 66 we obtained viable bone marrow cells from which total RNA could be extracted and RT–PCR experiments performed. Primer sequences used for these experiments are listed in Figure 2. The PCR products were purified and sequenced.

Quantitative RT–PCR (Q RT–PCR)

cDNA from patients no. 5 and 13 carrying a t(5;11;12)(q35;p15;q24) translocation and a t(8;11)(p11;p15) translocation, respectively, were amplified with a forward primer specific to *NUP98* and two reverse primers specific for *NSD1* and *NSD3* (see Figure 2), in the presence of the qPCR Master Mix for SYBR green I (Eurogentec, Liege, Belgium). After a denaturation step (10 min at 95°C), 45 cycles of amplification (10 s at 95°C followed by 1 min at 60°C) were performed on a Stratagene MX3000p instrument. For each cycle, data were collected at the end of the extension step. Fluorescence recorded was then plotted against the number of cycles.

Results

NUP98 *rearrangements*

Dual color FISH experiments using the '*NUP98* probe' detected a disruption of the *NUP98* gene (see Figure 2b) in 23 patients (35%) (Table 1, GFCH patients). Fourteen patients (60%) were female, four (17%) were children, 11 (48%) had a *de novo* AML/MDS and eight (35%) a treatment-related AML/MDS. T-ALL was diagnosed in four patients (17%). In the present series no *NUP98* rearrangement was found in B-lymphoid malignancies or in chronic myeloproliferative disorders.

A comparison of the karyotypes of patients with and without *NUP98* a rearrangement showed that karyotypes with a *NUP98* rearrangement were always simple in the stemlines (less than four chromosomal abnormalities), whereas the karyotypes of patients without *NUP98* rearrangement were mainly complex. These karyotypes can be obtained upon request to serge.romana @nck.aphp.fr

NUP98 partners detection

Dual color FISH experiments, RT–PCR and RQ–PR were performed to identify the *NUP98* partner genes (see Figure 1c-m for FISH results and Figure 2a for RT–PCR and 2b for RQ–PCR). The rearrangements were subdivided into three classes.

Recurrent chromosomal abnormalities involving NUP98. As expected, recurrent chromosomal translocations already described by others were found in the samples studied. A t(7;11)(p15;p15.4). translocation was found in seven patients (nos. 6–9, 11–12, 61): four cases with a *de novo* acute

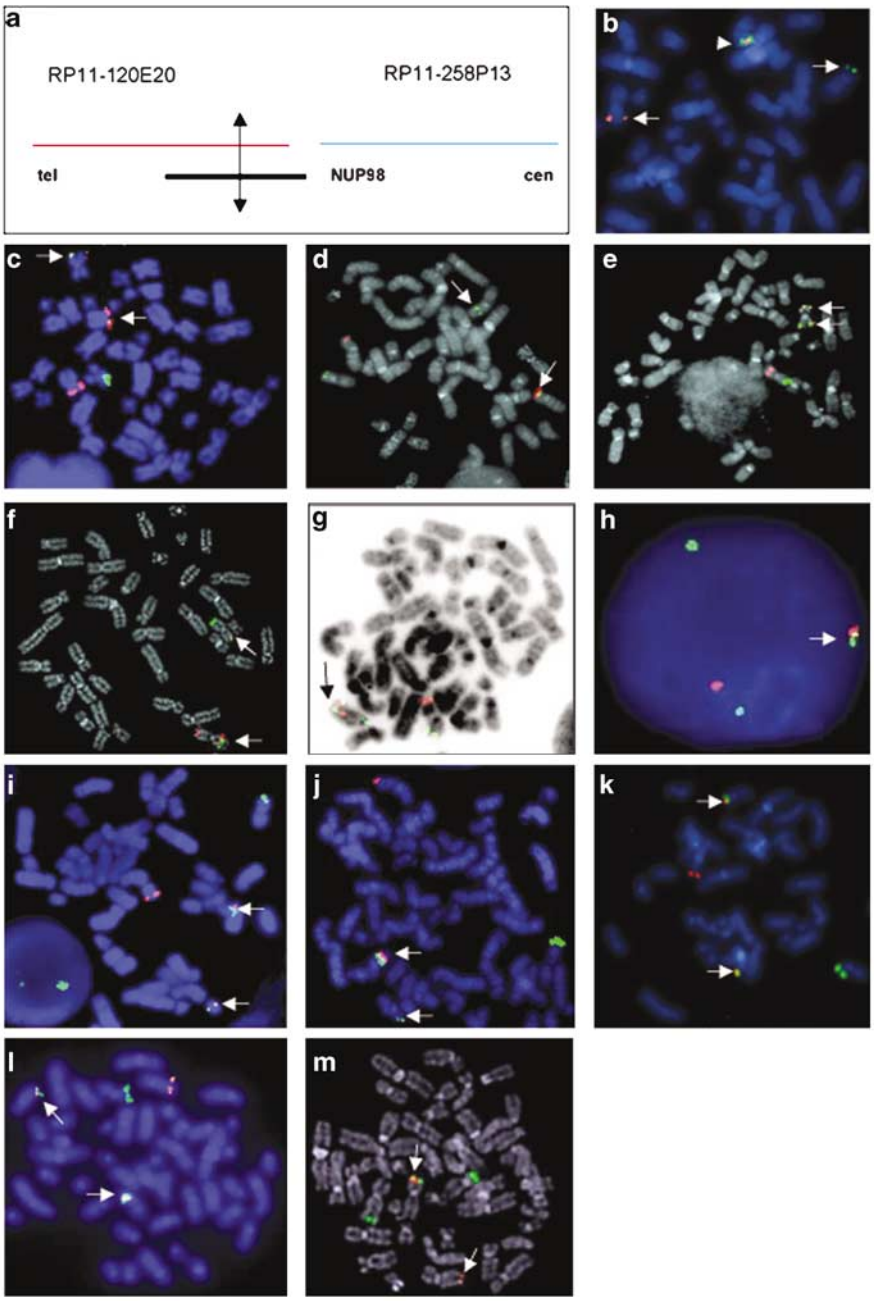
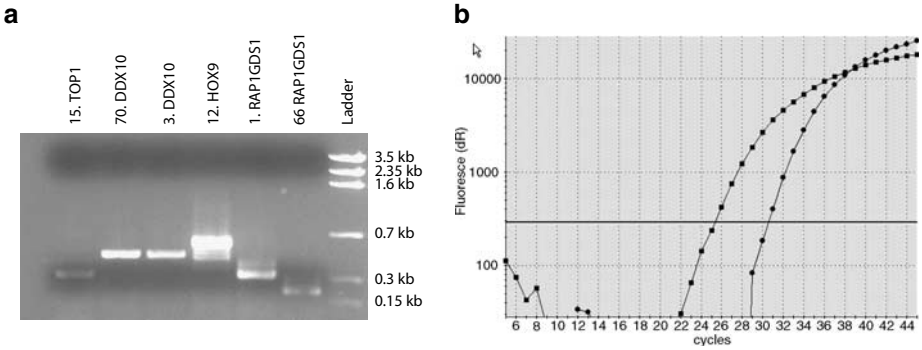


Figure 1 FISH experiments. (**a**) Schematic representation of the 'NUP98 probe'. (**b**) Screening for *NUP98* disruption with the '*NUP98* probe': RP11-120E20 labeled in FITC (green) and RP11-258P13 labeled in Rhodamine d-UTP (red). Example of patient 17 with a NUP98 disruption due to a recurring t(3;11)(q21;p15) translocation: a strong signal, located on the normal chromosome 11 (arrow head), a green signal on the der(3) chromosome (arrow) and a strong green signal colocalized with a faint red signal on the der(11) chromosome (arrow) (due to the asymetric splitting of the RP11-120E20) are observed. (**c**–**m**): Detection of NUP98/partner gene fusions by FISH. The two *NUP98* BAC probes were labeled by FITC d-UTP (green) and the partner gene probe by Rhodamine d-UTP (red). Arrows indicate the derivative chromosomes. (**c**) A t(7;11) translocation with *NUP98/HOXA*; (**d**) a t(7;11) translocation without *HOXA* locus rearrangement; (**e**) an inv(11) inversion with *NUP98/DDX10*; (**f**) a t(11;11) translocation with *NUP98/DDX10*; (**g**) an ins(11) insertion with *NUP98/DDX10*; (**h**) a t(4;11) translocation with *NUP98/RAP1GDS1*; (**i**) a t(11;20) translocation with *NUP98/TOP1*; (**j**) a t(10;11) translocation with *NUP98/ADD3*; (**k**) a t(9;11) with *NUP98/PRRX2*; (**l**) a t(6;11) translocation with *NUP98/C6ORF80* and (**m**) a t(X;11)(q28;p15) translocation. For this last patient (no. 17), the NUP98 probe is labeled with FITC and the telomeric probe RP11-479B17 is labeled with rhodamine.

myelomonocytic leukemia, two with AML with maturation and only one therapy-related AML. In six of the seven patients, dual FISH using a NUP98 probe and a HOXA probe indicated the classical fusion between the two loci (Figure 1c) with a double yellow colocalization on the two derivative chromosomes 7 and 11 besides normal green and red signals, respectively, on the unrearranged chromosomes. Owing to the shortage of material, we could amplify a NUP98 exon 12/HOXA9 exon 1b transcript fusion only in patient 12 (Figure 2a). In patient 61 (Figure 1d), the HOXA signal probe was located on both chromosomes 7,



c

Primer	Oligonucleotide sequence (5' -3')	Gene
NUP98-1 ((forward)	GGAGTAACCCAAGCCTCACAGC	NUP98
NUP98-2 (forward)	CTACGACAGCCACTTTGGG	NUP98
NUP98-3 (forward)	ATTTGGTACAACCAGTGGC	NUP98
NUP98-4 (forward)	GGGAACAACCAACCTAAGA	NUP98
NUP98-5 (forward)	TGGAAGTAAACCAGCACCTG	NUP98
NUP98-6 (forward)	TCTTGGTACAGGAGCCTTTG	NUP98
RAP1GDS1 (reverse)	TGCAGGAAGACTGTGGAGTC	RAP1GDS1
NSD1 (reverse)	TCCAAAAGCCACTTGCTTGGC	NSD1
NSD3 (reverse)	GACATGATATTCTCGGGCA	NSD3
HOXA9 (reverse)	GGGCACCGCTTTTTCCGAGT	HOXA9
HOXA11 (reverse)	CGCTGGAGTCTTAGAGGAGTGG	HOXA11
HOXA13 (reverse)	CGTGGCGTATTCCCGTTTCAAGTTC	HOXA13
DDX10 (reverse)	GCTGCAGCTCACAGACTATG	DDX10
TOP1 (reverse)	CACTTGATGCCTTCAGGAT	TOP1

Figure 2 PCR experiments. (**a**) RT-PCR: Patient 15: NUP98 exon13/*TOP1 exon 8*: tgtcagaccctaagaagaaggaagag – *gatggtaaattgaaaaaacccaagaa*. Patient 70 and No 3: NUP98 exon 14/*DDX10 exon 7*: gccaatggagcattcatgcccaa – *cacccctgccactttggaaca*. Patient 12: NUP98 exon 12/*HOXA9 exon 2*: tttggagccccccaggccccagtag – *ttgatagaaaaaacaacccagcgaa*. Patient 1: NUP98 exon 11/*RAP1GDS1 exon 2*: gggcttggtggtgcaggatttggaacag – *atacggaaacaagtgaaaaaatcaa*. (**b**) Quantitative RT-PCR: Detection of *NUP98/NSD1* fusion (curve with dots) and *NUP98/NSD3* fusion (curve with squares). (**c**) Oligonucleotide primer sequences: NUP98-1 was used for the amplification of NUP98/HOXA9, NUP98/HOXA11 and NUP98/HOXA13; NUP98-2 was used for the amplification of NUP98/TOP1; NUP98-3 was used for the amplification of NUP98/RAP1GDS1; NUP98-4 was used for the amplification of NUP98/DDX10; NUP98-5 was used for the amplification of NUP98/NSD3and NUP98-6 was used for the amplification of NUP98/NSD1.

whereas the NUP98 probe generated one signal on the unrearranged chromosome 11, one on the derivative 11 and a third signal colocalized with the HOXA probe on the derivative chromosome 7. Specific RT–PCR did not detect a NUP98/HOXA9, nor NUP98/HOXA11, nor a *NUP98/HOXA13* fusion genes in this case. We deduced that a new chromosomal 7p15 breakpoint was involved.

Various chromosome rearrangements involving 11p15 and 11q22 suggesting a *NUP98/DDX10* fusion gene were detected in four cases: two cases (no. 4 and 70) with a classical inv(11)(p15q22) inversion, one case (no. 2) with a t(11;11)(p15;q22) translocation and one case (no. 3) with an ins(11)(q22;p11p15) insertion. In the two first cases, dual color FISH experiments with BACs overlapping the *DDX10* locus as well as the *NUP98* locus confirmed the karyotypic abnormality with a double colocalization on the inverted chromosome 11 (Figure 1e). The same FISH experiment in patient 2 showed a colocalization of signals on the two derivative chromosomes 11 confirming the diagnostic of t(11,11)(p15;q22) translocation (Figure 1f). In patient 3, an ins(11)(q?p11p15.4) insertion was suspected because the der(11) appeared as an acrocentric chromosome. The *NUP98* probe generated two signals on the der(11), one on the telomeric part of the small arm and one near the extremity of the long arm. On the other hand, the *DDX10* probe generated a signal fused with the telomeric *NUP98* 11q signal and one, more centromeric, on the der(11)(q22) chromosome (Figure 1g). This combination of signals corresponds to an inverted insertion of the p11p15.4 bands into the *DDX10* locus on 11q22. For patients 2 and 3, RT–PCR amplified a *NUP98* exon14/*DDX10* exon 7 transcript fusion (Figure 2a). These *NUP98/DDX10* fusion genes were associated with an acute monocytic leukemia (patient no. 3), an acute myelomonocytic leukemia (patient no. 4), a therapy-related MDS (patient no. 2) and a therapy-related AML (patient no. 70).

A translocation t(4;11)(q21;p15) was observed in patients 4 and 66, both having an T-ALL. By dual color FISH experiments, only interphase nuclei could be analysed in these two patients. Figure 1h shows the signals observed: one red signal coming from the normal *RAP1GDS1* locus hybridization, two green signals and a colocalized signal. As the two BACs chosen for *RAP1GDS1* detection cover the middle and the 3′ part of the gene and because the classical *RAP1GDS1* t(4;11) breakpoint is located in intron 1, we deduced that the signal colocalization represented the *NUP98/RAP1GDS1* fusion gene located on the der(11). This was confirmed by specific RT–PCR experiments that showed a *NUP98/RAP1GDS1* transcript fusion in both patients (Figure 2a). As a result of material degradation, we could not sequence patient 66 amplification product.

A translocation t(11;20)(p15;q11) was found in two patients: patient 15 with an AML without maturation and patient 16 with a therapy-related AML. Dual color FISH showed a double colocalization signal indicating a *NUP98/TOP1* and its reciprocal *TOP1/NUP98* fusion (Figure 1i). RT–PCR confirmed this result in patient 15 (Figure 2a).

Patient 5 having a biphenotypic acute leukemia (BAL) presented a t(5;11;12)(q35;p15.4;q24) translocation. FISH could

Table 1 Clinical and cytogenetic characteristics of 96 patients with rearrangements involving *NUP98*

Age	*Sex*	*ATCD*	*Treatment*	*Disease*	*Karyotype*	*Partners*	*References*
23	M			T-ALL	46,XY,t(10;11)(q25;p15)	*adducin 3*	Lahortiga *et al*.[32]
60	F	Sézary	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XX,t(10;11)(q24;p15) [9]/47,idem,-12,+mar1,+mar2 [6]	*adducin 3*	GFCH
0.08	M			Acute monocytic leukemia	46,XY,ins(11)(p11q23) [14]/46,XY [2]	*DDX10*	GFCH
60	F			Acute myelomonocytic leukemia	46,XX,inv(11)(p11q23),del(12)(p13) [20]	*DDX10*	GFCH
6.4	M			AML nondetermined	46,XX,inv(11)(p15q22.3)[3]/46,XY, idem, + others	*DDX10*	Nebral *et al*.[27,38]
7	M			AML with multilineage dysplasia	46,XY,inv(11)(p15q22)[20]	*DDX10*	Arai *et al*.[18]
14	M			AML without maturation	47,XY,inv(11)(p15q22),+21[16]	*DDX10*	Arai *et al*.[18]
58	M			CML-BC	46,XY,t(9;22), t(9;11)(p22;p15)	*DDX10*	Yamamoto *et al*.[19]
18.3	M	APL	N	Therapy-related AML	46,XX,inv(11)(p15q22.3)	*DDX10*	Nebral *et al*.[27,38]
47	F	BK	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XY,inv(11)(p15q22)[17]/46,XX[6]	*DDX10*	GFCH
4	F	ALL	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XX,inv(11)(p15q22.3) [16]	*DDX10*	Arai *et al*.[18]
51	M	K	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XY,inv(11)(p15q22)	*DDX10*	Ikeda *et al*.[20]
61	M	NHL	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XY,t(3;5)(p13;q35),inv(11)(p15q22)[9]/4+66,XY [1]	*DDX10*	Arai *et al*.[28]
55	F	BK	Other	Therapy-related MDS	46,XX,t(11;11)(p15;q22) [9]/46,XY [11]	*DDX10*	GFCH
50	M	?	I-TOPOII	Therapy-related MDS	46, XY,inv(11)(p15q22)	*DDX10*	Nakao *et al*.[21]
74	F			Acute myelomonocytic leukemia	46,XX,t(7;11)(p15;p15) [19]/46,XX [1]	*HOX A*	GFCH
80	F			Acute myelomonocytic leukemia	46,XY,t(7;11)(p15;p15) [18]/46,XY [2]	*HOX A*	GFCH
55	M			Acute myelomonocytic leukemia	46,XY,t(7;11)(p15;p15) [20]	*HOX A*	GFCH
46	M			AML with maturation	46,XY,t(7;11)(p15;p15) [9]/46,XY [3]	*HOX A*	GFCH
47	M			AML with maturation	46,XY,t(7;11)(p15;p15) [21]/46,XY [1]	*HOX A*	GFCH
77	M	MZL	Other	Therapy-related AML	46,XY,t(7;11)(p15;p15) [20]	*HOX A*	GFCH
58	F			CML Ph1-	46,XX,t(7;11)(p15;p15)	*HOXA11*	Suzuki *et al*.[54]
57	F			AML with maturation	46,XX,t(7;11)(p15;p15)	*HOXA13*	Taketani *et al*.[55]
41	F			Acute myelomonocytic leukemia	46, XX, t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Huang *et al*.[42]
58	F			AML nondetermined	46, XX, t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Fujimura *et al*.[56]
30	F			AML with maturation	46, XX, del(5)(q31q35)der(11)t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Huang *et al*.[42]
36	F			AML with maturation	46, XX, t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Huang *et al*.[42]
36	M			AML with maturation	47, XY, t(7;11)(p15;p15), r(12)	*HOXA9*	Huang *et al*.[42]
41	M			AML with maturation	46,XY,t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Kwong and Pang[43]
52	M			AML with maturation	46,XX,t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Kawakami, 2002
76	F			AML with maturation (M2)	46,XY, t(7;11;13;17)	*HOXA9*	Lahortiga *et al*.[5]
69	F			AML with multilineage dysplasia	46,XX,t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Hatano *et al*.[57]
27	M			CML-BP	46,XY,t(7;11)(p15;p15),t(9;22)(q34;q11.2)	*HOXA9*	Yamamoto *et al*.[19]
45	M			Acute myelomonocytic leukemia	46, XY, t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Morris *et al*.[58]
53	F			CML-BP	46,XY,t(7;11)(p15;p15),t(9;22)(q34;q11.2)	*HOXA9*	Ahuja *et al*.[59]
45	M			CMML	46,XY,t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Hatano *et al*.[57]
31	M			CMMoL (LMMC)	46, XY, t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Wong *et al*.[60]
2	M	ALL	I-TOPOII	Therapy-related AML	46, XY, add(6)(p21),t(7;11)(p15;p15)	*HOXA9*	Nishiyama *et al*.[44]
45	M			Acute monocytic leukemia	46,XY,t(11;12)p15;q13)[9]/46,XX[11]	*HOXC11*	Gu *et al*.[61]
22	F			AML with maturation	46,XX, t(11;12)(p15;q13)[10]/46,XX[3]	*HOXC11*	Gu *et al*.[61]
45	F			AML with maturation	46,XX,t(11;12)(p15;q13)	*HOXC11*	Gu *et al*.[61]
14	M			AML without maturation	46, XY,t(11;12)(p15;q13)	*HOXC11*	Taketani *et al*.[55]
47	F			AML with maturation	46,XX,t(11;12)(p15;q13)	*HOXC13*	Panagopoulos *et al*.[62]
57	F			AML with maturation	46,XX,t(11;12)(p15;q13)	*HOXC13*	La Starza *et al*.[63]
39	F	H	Other	Therapy-related AML	46,XX,t(11;12)(p15;q13),t(17;21)(q11;q22)	*HOXC13*	Kobzev *et al*.[4]
15	M			Acute myelomonocytic leukemia	46,XY, t(2;11)(q31;p15)	*HOXD11*	Taketani *et al*.[55]
0.8	F			Acute myelomonocytic leukemia	46,XX, t(2;11)(q31;p15)[18]/46,XX[2]	*HOXD13*	Shimada *et al*.[64]
62	M			Acute myelomonocytic leukemia	46,XX, t(2;11)(q31;p15)	*HOXD13 and NF1*	Arai *et al*.[28]
15	F			CML	46,XX, t(2;11)(q31;p15), t(9;22)(q34;q11q32)	*HOXD13*	Kobzev *et al*.[4]
10	M	ALL-B	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XY, t(2;11)(q31;p15)	*HOXD13*	Raza-Egilmez, 1998

Table 1 Clinical and cytogenetic characteristics of 96 patients with rearrangements involving *NUP98*

Age	*Sex*	*ATCD*	*Treatment*	*Disease*	*Karyotype*	*Partners*	*References*
60	F			AML with maturation	46,XX, t(9;11)(p22;p15)	*LEDGF*	Hussey *et al*.[9]
5	F			AML with maturation	46,XX,T(9;11)p22;p15)	*LEDGF*	Morerio *et al*.[11]
52	M			AML without maturation	46,XY,t(9;11)(p22;p15)	*LEDGF*	Ahuja *et al*.[8]
29	M			CML accelerated	46,XY,t(9;22), inv(p15q22)(15)	*LEDGF*	Grand *et al*.[10]
3	F			MDS	46, XX, t(3;11)(q12.2;p15)	*NP3*	GFCH
36	F			T-ALL III My+ CD10-	46,XX,t(3;11)(q12.2;p15),del(12)(q14;q24) [17]/46,XX [2]	*NP3*	GFCH
5	F			Acute megakaryoblastic leukemia	46, XX,t(6;11)(q24.1;p15.5)	*C6ORF80*	Tosi *et al*.[29]
26	M			T-ALL II CD10+	46,XY,t(6;11)(q21-22;p15),add(12)(p13) [17]/46,XY [3]	*C6ORF80*	GFCH
74	F			Acute myelomonocytic leukemia	46,XX,t(7;11)(p15;p15) [26]/46,XX [4]	*NP7*	GFCH
73	F	BK	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XX,t(5;12)(q11;p13) [7]/46,idem,add(4)(q11),add(11)(p15),der(17)t(4;17)(q11-12) [10]	*NPX*	GFCH
3	M			Acute myelomonocytic leukemia	46,XY,del(5q)	*NSD1*	Jaju *et al*.[65]
3	F			AML with maturation	46,XX,del(5q)	*NSD1*	Jaju *et al*.[65]
4	M			AML with maturation	46,XY,del(5q)	*NSD1*	Cerveira *et al*.[66]
5	M			AML with maturation	46,XY	*NSD1*	Brown *et al*.[14]
12	M			AML with maturation	46,XY,del(5q)	*NSD1*	Jaju *et al*.[65]
3.9	F			AML with maturation (M2)	46,XX,t(1;18)(q32;q21),del(11)t(5;11)(q35;q15)	*NSD1*	Nebral *et al*.[27,38]
14	F			AML without maturation	46,XX	*NSD1*	Panarello *et al*.[13]
18	F			AML without maturation	46,XX	*NSD1*	Brown *et al*.[14]
55	M			Biphenotypic leukemia	46,XY,t(5;11;12)(q35;p15;q24)	*NSD1*	GFCH
65	M			MDS	46,XY, add(11)(p15)	*NSD1*	La straza *et al*.[15]
65	F			AML without maturation	46,XX, t(8;11)(p11;p15)	*NSD3*	Rosati *et al*.[17]
70	F	BK	I-TOPOII	Therapy-related MDS	46,XX,t(8;11)(p11;p15),add(16)(q22)	*NSD3*	GFCH
42	M			CML accelerated	46,XY,t(1;11)(q21;p15),t(9;22)(q34;q11)[30]	*PRRX1*	Kobzev *et al*.[4]
44	F	BK	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XX,t(1;11)(q25;p15)[17]/46,XX[3]	*PRRX1*	Kobzev *et al*.[4]
53	M	NHL	Other	Therapy-related AML	46,XY,t(1,11)(q23 ;p15),add(7)(q22)	*PRRX1*	Nakamura *et al*.[6]
45	M	Vaquez	alkylant	Therapy-related AML	47,XY,der(5)t(5;11)(q35;q13),add(11)(p15),+mar [5]/48,idem,+marx2 [10]	*PRRX2*	GFCH
65	F	NHL-B	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XX,t(9;11)(q34;p15)	*PRRX2*	Gervais *et al*.[7]
16	F			T-ALL	47,XX,t(4;11)(q21;p15),+ 8	*RAP1GDS1*	Mecucci *et al*.[31]
18	M			T-ALL	46,XY,t(2;21)(q11;q11), t(4;11)(q21;p15)[15]/46, XY[6].	*RAP1GDS1*	Yuri 2004
21	M			T-ALL	46,XY,t(4;11)(q21;p15), +2mar	*RAP1GDS1*	Hussey *et al*.[30]
25	F			T-ALL	46,XX, t(4;11)(q21;p15), del(12)p13), + del(13)(q12q14)	*RAP1GDS1*	Hussey *et al*.[30]
38	F			T-ALL	47,XX,t(4;11)(q21;p15),+mar	*RAP1GDS1*	Cimino *et al*.[67]
49	M			T-ALL	46,XY,t(4;11)(q21;p15), del(5)(q12q14)	*RAP1GDS1*	Hussey *et al*.[30]
19	M			T-ALL II CD10-	46,XY,t(4;11)(q21;p15) [3]/46,XY [19]	*RAP1GDS1*	GFCH
10	F			T-ALL II CD10+/CD117	46,XX,t(4;11)(q21;p15) [10]/46,XX [3]	*RAP1GDS1*	GFCH
29	F			Acute monocytic leukemia	46,XX, t(11;20)(p15;q11) [10]	*TOP1*	Chen *et al*.[26]
2	F			AML with maturation	46,XX,del(4)(q?13q?21),t(11;20)(p15;q11)[20]	*TOP1*	Kobzev *et al*.[4]
16	F			AML with maturation	46,XX, t(11;20)(p15;q11) [23]/46,XX [3]	*TOP1*	Potenzal *et al*.[23]
48	F			AML with maturation	46,XX, t(11;20)(p15;q11) [20]	*TOP1*	Iwase *et al*.[24]
11	F			AML without maturation	46,XX,t(11;20)(p15;q11) [27]	*TOP1*	GFCH
56.5	F		N	Therapy-related AML	46,XY, t(11;20)(p15;q11) [16]/45,idem,-21 [4]	*TOP1*	Nebral *et al*.[27,38]
51	F	BK	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XX,t(11;20)(p15;q11) [19]/46,XX [1]	*TOP1*	GFCH
15	M	NHL	I-TOPOII	Therapy-related AML	46,XY, t(11;20)(p15;q11) [17]/45,idem,-5 [3]	*TOP1*	Ahuja *et al*.[8]
60	F	K Colon	Other	Therapy-related AML	46,XX,t(10;20;11)(q24;q11;p15)[24]/46,XX[1]	*TOP1*	Panagopoulos *et al*.[62]
4	F	ALL	I-TOPOII	Therapy-related MDS	46,XX, t(11;20)(p15;q11)	*TOP1*	Ahuja *et al*.[8]
63	M			Acute monocytic leukemia	46,XY,t(3;11)(p24;p15)	*TOP2*	Nebral *et al*.[27,38]

The study includes a total of 96 patients: 23 *NUP98* described in this study (designed in the table as GFGH) and 73 patients described in the literature all carrying a *NUP98* disruption.
NP3, NPX and NP7 = putative gene fused to NUP98, respectively, by the t(3;11)(q12.2; p15), the t(X;11)(q28;p15) and the t(7;11)(p15;p15).
APL = Acute promyelocytic leukemia; BK = breast cancer; ALL = acute lymphoblastic leukemia; K = cancer; MZL = marginal zone B-cell lymphoma; H = Hodgkin's disease; NHL = non-Hodgkin's lymphoma; I-TOPOII = DNA topoisomerase II poison.

not be performed but RQ–PCR revealed a *NUP98/NSD1* fusion transcript (Figure 2b).

Emerging recurrent chromosomal rearrangements. Four translocations can now be classified as recurrent abnormalities since we add a second example to a chromosomal rearrangement reported previously.

A t(8;11)(p11.2;p15. 4) translocation described once by Rosati *et al.*[17] in 2002, was detected in patient 13 and was associated with a therapy-related MDS. This suggested a *NUP98/NSD3* fusion that was confirmed by RQ–PCR (Figure 2b).

A t(10;11)(q24;p15) translocation described by Lahortiga *et al.*[32] was found in patient 14 who had a therapy-related AML. With dual color FISH we could demonstrate a *NUP98/ADD3* fusion. Indeed, a colocalization of the *NUP98* and the *ADD3* probes was seen on the der(11). However, no colocalized signal was detected on the der(10) because of the lack of the *ADD3* signal on this chromosome. We deduced that the der(10) was bearing a *5′ADD3* gene deletion (Figure 1j).

A t(9;11)(q34;p15) translocation first described in 2005 by Gervais *et al.*,[7] was found in patient 18 suffering from a therapy-related leukemia. We used a BAC spanning the *PRRX2* gene locus in dual color FISH experiments with the '*NUP98* probe' and we detected a double colocalization signal on the two derivative chromosomes indicating a *NUP98/PRRX2* fusion (Figure 1k)

A t(6;11)(q21–22;p15) translocation was detected in patient 19 with T-ALL. We found that the BAC RP11-900M13 containing the *C6orf80* gene locus was split by the translocation. Dual color FISH experiments with the '*NUP98* probe' and BAC RP11-900M13 detected a double colocalization indicating a recombination between the two genes and relocalized the chromosomal 6 breakpoint to 6q24.1 (Figure 1l). Southern blot analysis demonstrated a fusion between *NUP98* intron 13 and *C6orf80* intron 2 and a specific RT–PCR amplified a fusion between *NUP98* exon 13 and *C96orf80* exon 2 (A Petit, personal communication). Although this analysis was in progress, Tosi *et al.* described recently the same fusion gene in a patient who presented with an acute megakaryocytic leukemia (AML-M7).[29]

New chromosomal rearrangements invloving NUP98. Finally, two new translocations disrupting the *NUP98* locus were found in the present study: a t(3;11)(q12.2;p15.4) translocation in two patients, with T-ALL (patient 20) and a MDS (patient 71), and a t(X;11)(q28;p15) translocation in patient 17 having a therapy-related AML. This patient showed a t(5;12) as the only one chromosomal abnormality observed in the stemline and an add(11)(p15) chromosome in two sidelines. FISH with the '*NUP98* probe' showed a split *NUP98* signal with one signal on the der(11) chromosome and one on a chromosome that looked like a chromosome X on the basis of the DAPI inverted image. To prove that it was a t(X;11) translocation, we cohybridized the *NUP98* probe with an Xq telomeric probe. We observed two Xqtel signals, one on the nonrearranged chromosome X and one colocalized with the splitted *NUP98* probe signal on the der(11) chromosome. Two other *NUP98* probe signals were observed on the nonrearranged chromosome 11 and on the der(X)(qtel) chromosome (Figure 1m). This combination of signals was observed in every mitosis studied. We deduced that patient 17 carried a semicryptic t(X;11)(q28;p15) translocation present in all leukemic cells.

Discussion

FISH analysis of 66 patients with hematological malignancies associated with a chromosome 11p15 anomaly, allowed us to detect 23 (35%) patients carrying a chromosome 11 anomaly involving the *NUP98* gene and 12 other loci from various chromosomes. The percentage of *NUP98* rearrangements detected in our series is similar to the results observed in a recent study using FISH on patients selected on the presence of 11p13–p15 rearrangements (five patients out of 14: 35%).[38] It is higher than the frequency observed by Kobzev *et al.*[4] where seven out of 46 patients studied (15%) had a *NUP98* anomaly. As expected, several rearrangements such as those recombining *NUP98* with *HOXA* cluster locus, *DDX10*, *TOP1* and *RAPAGDS1* were also observed in the present study. Four translocations t(10;11)(q24;p15), t(6;11)(q24;p15), t(9;11)(q34;p15) considered unique previously and t(8;11)(p11.2;p15) are now emerging as recurrent rearrangements. An unusual rearrangement of NUP98 was observed in a patient with a t(7;11)(p15;p15) translocation but no fusion with any of HOXA genes. This abnormality, resembling the one reported by Takeshita *et al.*[39] in 2004, suggests the existence of alternative breakpoints on chromosome 7. Finally, two new translocations were identified. One involved the *NUP98* gene and band 3q21 (two cases). The other one involved band Xq28. The molecular characterization of these chromosomal rearrangements is ongoing.

This study confirms that *NUP98* is the target of many chromosomal abnormalities and that, contrary to previous claims, various *NUP98* disruptions are found in Caucasians as well as in Asian populations.[40–43]

The incidence of chromosome-associated *NUP98* rearrangements observed in patients with various hematopoietic malignancies[16,38,43,44] is low (1–2%). In comparison, other genes such as *MLL*, *RUNX1* and *TEL/ETV6* rearrange frequently in hematological malignant disorders. Owing to this low incidence, it appeared useful to pool the data of our 23 patients to those observed on 73 patients reported the literature (Table 1). Some conclusions can be drawn from the data obtained from this sample of 96 patients.

General cytogenetic characteristics of hematopoietic malignancies associated with a NUP98 *fusion gene*

All karyotypes of the 96 patients with a *NUP98* fusion were simple, that is, with no more than three chromosomal abnormalities before clonal evolution. This is true even in therapy-related AML and MDS patients whose karyotypes are often complex. In contrast, 24 of the 43 patients of this study who did not carry a *NUP98* fusion presented a complex karyotype.

As the *NUP98* locus is located 3 Mb from the 11p telomere, some *NUP98* rearrangements are cryptic (for example the t(5;11)(q34;p15) translocation) or subtle (for example the t(X;11)(q28;p15) translocation). The true incidence of chromosome rearrangements involving the *NUP98* locus may be underestimated at the present time. Screening other patients using FISH should unravel other rearrangements involving *NUP98*.

General clinical-hematological data in patients with a NUP98 *fusion gene*

Eighty percent of the 96 patients with disruption of the *NUP98* gene have AML or MDS. Three quarters occurred *de novo* and

one quarter were therapy-related AML or MDS. The *de novo* AML group is mainly composed of AML with maturation (AML-M2) (60%) and myelomonocytic leukemia (AML-M4) (about 20%). Only 8% of the patients were suffering from MDS (4% *de novo* and 4% therapy related). Interestingly, 12% were associated with a T-ALL. Also, no B-lymphoid proliferation was associated with a disruption of the *NUP98* gene.

The NUP98 *gene partners can be classified in three groups*

As far as we know, already 19 genes are described as fused to *NUP98* in various hematopoietic malignancies. The most common *NUP98* gene partners are the *HOX* gene family, *DDX10*, the *NSD* gene family, the Topoisomerase (*TOP1 and TOP2B*) genes and *RAP1GDS1*. All these genes have been reported to fuse with NUP98 at least eight times (Table 1). According to the clinico-hematological data, we propose to subclassify these genes in three groups.

The first group is composed of genes that are mainly associated with *de novo* myeloid malignancies. It comprises the *HOX* and the *NSD* genes. Indeed 33 of 37 (90%) of *NUP98/HOX* fusions and 11 of 12 (90%) of *NUP98/NSD* fusions were found in *de novo* myeloid malignancies. The contribution of each HOX gene as well as the *NSD1* and *NSD3* genes in *NUP98/HOX* and *NUP98/NSD* fusions are indicated in Table 1. Patients with *NUP98/HOX* fusions tend to be older than patients with *NUP98/NSD* fusions (6/37 and 8/12 younger than 20 years, respectively). Interestingly, in both translocations, most of the translocation breakpoints lie within introns 11 or 12 (Figure 3).

Both HOX and NSD genes are involved in morphogenetic processes occurring during embryogenesis. The *HOX* genes form a complex system playing a major role in the organization of the antero-posterior axis and segmentation of the body. In addition to their role during embryogenesis, it has been demonstrated that *HOX* genes are involved during normal hematopoiesis.[45–48] The *NUP98/HOX* fusion generates an hybrid protein with an homeodomain fused to the GLFG domain of *NUP98*. In mouse models, the Nup98/Hox fusion proteins have transforming potentialities[49,50] dependent on the integrity of the HOX homeodomain. The FG repeats of the Nup98 moiety are also essential to provide these transforming properties presumably through the recruitment of transcriptional coactivators such as CBP/p300.[36] *NSD1* and *NSD3* encode (as *NSD2*) a nuclear-receptor set domain proteins. Constitutional haploinsufficiency of *NSD*1 and *NSD2* induces congenital malformations, respectively Sotos[51] and Wolf-Hirschhorn syndromes.[52] The N-terminal part of NSD protein contains a nuclear receptor interactive domain. The middle and the C-terminal part contain five PHD domains and a SET domain, as in the Trx and polycomb proteins, two protein families known for their role in the regulation of *HOX* gene expression during embryogenesis. However, the precise role of NSD proteins either during embryogenesis or during hematopoiesis are still unknown. In the majority of *NUP98/NSD* fusions studied, the breakpoints are located in intron 12 of *NUP98* (6/8), in intron 5 of *NSD1* and in intron 3 of NSD3. The hybrid protein contains the N-terminal GLFG Nup98 domain fused to almost the entire NSD protein except its nuclear receptor interactive N-terminal domain. The precise role of these fusion proteins during the leukemic processes remains to be investigated.

The second group is composed of genes that are often associated with therapy-related myeloid disorders. It comprises the *TOP* family genes (*TOP1* and *TOP2)*, and *DDX10.* Indeed, seven of 13 cases of NUP98 fusions with *DDX10* and five of 10 fusions with *TOP1* are found in therapy-related myeloid disorders. Together, they account for 25% of *NUP98* partners, 14% (13/96) for *DDX10* and 11% (11/96) for *TOP1* and *TOP2B* (Table 1). In half of the patients with NUP98 gene fusion the hematologic disorder occurs in young patients, that is, less than 20 years old. Surprisingly, nine of 10 patients with a *NUP98/TOP1* fusion were females. Interestingly, In fusions involving these genes, the breakpoints localisation within *NUP98* are nonrandom (Figure 3). They were located within intron 13 of the *NUP98* gene in all cases of *NUP98/TOP1* fusions and mainly in intron 14 (10 patients, and only one in intron 12) in *NUP98/DDX10* fusions. Genes of this group are all involved in unwinding and relaxing nucleic acid molecules.

The third group has only one member, the *RAP1GDS*1 gene which is involved in T-ALL (all the eight cases reported until now). *NUP98/RAP1GDS1* fusions represent 9% (8/96) of the *NUP98* fusion genes (Table 1). Half of these patients are less 20

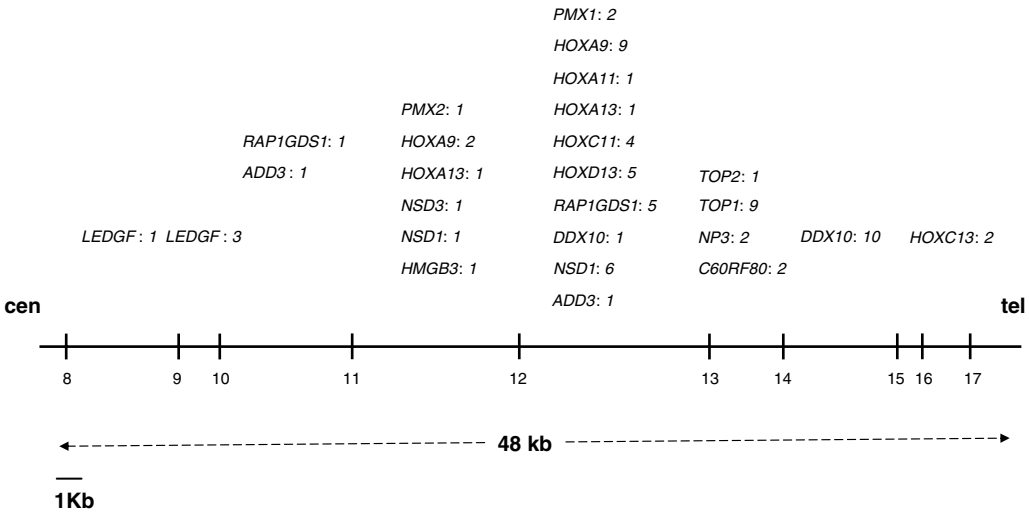


Figure 3 *NUP98* breakpoints localization. Molecular data of 92 -*NUP98*/partner genes show a *NUP98* clustering of genomic breakpoints depending on the partner gene. Each partner gene is listed above the *NUP98* specific breakpoints. The figure after the *NUP98* partner genes indicates the number of patients bearing this *NUP98*/partner fusion.

years old. There is no sex ratio deviation. In contrast to gene of group 1 and 2, the *RAP1GDS1* gene codes for smgGDS, a cytoplasmic protein belonging to the Armadillo (ARM) family proteins. SmgGDS promotes guanine nucleotide exchange by small GTPases like Rac1 and RhoA. In this way, it interferes with the regulation of the actin assembly associated with membrane ruffling.[53] Different kinds of fusion transcripts can be generated by the t(4;11)(q21;p15) translocation. Until now, seven patients have been studied at the molecular level. The localisation of the breakpoints was always within the intron 1 of *RAP1GDS1* gene and intron 12 (five of the seven patients), intron10 (one)[30] and intron 11 (one of our cases) (Figure 3) of the *NUP98* gene. All these fusion transcripts encode a chimeric protein composed in its N-terminal part of the GLFG Nup98 domain and the entire protein smgGDS except its initial methionine. To date the involvement of Nup98/smgGDS in the leukemic process has not been proven in any experimental model.

The three groups represent altogether 86% of the *NUP98* fusions known today. The other 14% involved the *PRRX*, *LEDGF*, *ADD3* and *C6orf80* genes. It is too early to class them in one of the groups delineated above.

In conclusion, the validity of the classification of *NUP98* fusions proposed here remains questionable until more data are obtained on the function of the genes involved. If specific pathways are correlated with some fusions or common to all of them remains an open question. The use of microarray technology will help to answer this question. Two major conclusions may be drawn from the present study. Firstly, owing to their cryptic nature, there are probably further rearrangements which remain to be detected by cytogenetic and FISH methods. The detection of any new gene fusion and the analysis of its consequences will contribute to our understanding of the role of *NUP98* fusion genes. Secondly, the GFCH study included any hematopoietic disorders associated with a 11p15 abnormality. Only 23 exhibited a *NUP98* rearrangement. Analysis of patients with a 11p15 rearrangement not involving *NUP98* deserves further studies.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge S Nusbaum and F Poulain for excelent technical assistance. This work was supported by the Ligue contre le cancer (labeled team: SPR, IRW, AP, C.S, FNK, OAB, RB).

References

1 Nakamura T, Largaespada DA, Lee MP, Johnson LA, Ohyashiki K, Toyama K *et al*. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet* 1996; **12**: 154–158.
2 Borrow J, Shearman AM, Stanton Jr VP, Becher R, Collins T, Williams AJ *et al*. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet* 1996; **12**: 159–167.
3 Slape C, Aplan PD. The role of NUP98 gene fusions in hematologic malignancy. *Leuk Lymphoma* 2004; **45**: 1341–1350.
4 Kobzev YN, Martinez-Climent J, Lee S, Chen J, Rowley JD. Analysis of translocations that involve the NUP98 gene in patients with 11p15 chromosomal rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; **41**: 339–352.
5 Lahortiga I, Belloni E, Vazquez I, Agirre X, Larrayoz MJ, Vizmanos JL *et al*. NUP98 is fused to HOXA9 in a variant complex t(7;11;13;17) in a patient with AML-M2. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **157**: 151–156.
6 Nakamura T, Yamazaki Y, Hatano Y, Miura I. NUP98 is fused to PMX1 homeobox gene in human acute myelogenous leukemia with chromosome translocation t(1;11)(q23;p15). *Blood* 1999; **94**: 741–747.
7 Gervais C, Mauvieux L, Perrusson N, Helias C, Struski S, Leymarie V *et al*. A new translocation t(9;11)(q34;p15) fuses NUP98 to a novel homeobox partner gene, PRRX2, in a therapy-related acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 145–148.
8 Ahuja HG, Hong J, Aplan PD, Tcheurekdjian L, Forman SJ, Slovak ML. t(9;11)(p22;p15) in acute myeloid leukemia results in a fusion between NUP98 and the gene encoding transcriptional coactivators p52 and p75-lens epithelium-derived growth factor (LEDGF). *Cancer Res* 2000; **60**: 6227–6229.
9 Hussey DJ, Moore S, Nicola M, Dobrovic A. Fusion of the NUP98 gene with the LEDGF/p52 gene defines a recurrent acute myeloid leukemia translocation. *BMC Genet* 2001; **2**: 20.
10 Grand FH, Koduru P, Cross NC, Allen SL. NUP98-LEDGF fusion and t(9;11) in transformed chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2005; **29** (12): 1469–1472.
11 Morerio C, Acquila M, Rosanda C, Rapella A, Tassano E, Micalizzi C *et al*. t(9;11)(p22;p15) with NUP98-LEDGF fusion gene in pediatric acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2005; **29**: 467–470.
12 Jaju RJ, Fidler C, Haas OA, Strickson AJ, Watkins F, Clark K *et al*. A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in *de novo* childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; **98**: 1264–1267.
13 Panarello C, Rosanda C, Morerio C. Cryptic translocation t(5;11)(q35;p15.5) with involvement of the NSD1 and NUP98 genes without 5q deletion in childhood acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **35**: 277–281.
14 Brown J, Jawad M, Twigg SR, Saracoglu K, Sauerbrey A, Thomas AE *et al*. A cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in 2 children with acute myeloid leukemia with apparently normal karyotypes, identified by a multiplex fluorescence *in situ* hybridization telomere assay. *Blood* 2002; **99**: 2526–2531.
15 La Starza R, Gorello P, Rosati R, Riezzo A, Veronese A, Ferrazzi E *et al*. Cryptic insertion producing two NUP98/NSD1 chimeric transcripts in adult refractory anemia with an excess of blasts. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; **41**: 395–399.
16 Cerveira N, Correia C, Doria S, Bizarro S, Rocha P, Gomes P *et al*. Frequency of NUP98-NSD1 fusion transcript in childhood acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2003; **17** (11): 2244–2247.
17 Rosati R, La Starza R, Veronese A, Aventin A, Schwienbacher C, Vallespi T *et al*. NUP98 is fused to the NSD3 gene in acute myeloid leukemia associated with t(8;11)(p11.2;p15). *Blood* 2002; **99**: 3857–3860.
18 Arai Y, Hosoda F, Kobayashi H, Arai K, Hayashi Y, Kamada N *et al*. The inv(11)(p15q22) chromosome translocation of *de novo* and therapy-related myeloid malignancies results in fusion of the nucleoporin gene, NUP98, with the putative RNA helicase gene, DDX10. *Blood* 1997; **89**: 3936–3944.
19 Yamamoto M, Kakihana K, Kurosu T, Murakami N, Miura O. Clonal evolution with inv(11)(p15q22) and NUP98/DDX10 fusion gene in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **157**: 104–108.
20 Ikeda T, Ikeda K, Sasaki K, Kawakami K, Takahara J. The inv(11)(p15q22) chromosome translocation of therapy-related myelodysplasia with NUP98-DDX10 and DDX10-NUP98 fusion transcripts. *Int J Hematol* 1999; **69**: 160–164.
21 Nakao K, Nishino M, Takeuchi K, Iwata M, Kawano A, Arai Y *et al*. Fusion of the nucleoporin gene, NUP98, and the putative RNA helicase gene, DDX10, by inversion 11 (p15q22) chromosome translocation in a patient with etoposide-related myelodysplastic syndrome. *Intern Med* 2000; **39**: 412–415.
22 Ahuja HG, Felix CA, Aplan PD. The t(11;20)(p15;q11) chromosomal translocation associated with therapy-related myelodysplastic syndrome results in an NUP98-TOP1 fusion. *Blood* 1999; **94**: 3258–3261.
23 Potenza L, Sinigaglia B, Luppi M, Morselli M, Saviola A, Ferrari A *et al*. A t(11;20)(p15;q11) may identify a subset of nontherapy-related acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; **149**: 164–168.
24 Iwase S, Akiyama N, Sekikawa T, Saito S, Arakawa Y, Horiguchi-Yamada J *et al*. Both NUP98/TOP1 and TOP1/NUP98 transcripts are detected in a *de novo* AML with t(11;20)(p15;q11). *Genes Chromosomes Cancer* 2003; **38**: 102–105.

25 Ahuja HG, Felix CA, Aplan PD. Potential role for DNA topoisomerase II poisons in the generation of t(11;20)(p15;q11) translocations. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; **29**: 96–105.
26 Chen S, Xue Y, Chen Z, Guo Y, Wu Y, Pan J. Generation of the NUP98-TOP1 fusion transcript by the t(11;20) (p15;q11) in a case of acute monocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; **140**: 153–156.
27 Nebral K, Schmidt HH, Haas OA, Strehl S. NUP98 is fused to topoisomerase (DNA) IIbeta 180 kDa (TOP2B) in a patient with acute myeloid leukemia with a new t(3;11)(p24;p15). *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 6489–6494.
28 Arai Y, Kyo T, Miwa H, Arai K, Kamada N, Kita K *et al.* Heterogenous fusion transcripts involving the NUP98 gene and HOXD13 gene activation in a case of acute myeloid leukemia with the t(2;11)(q31;p15) translocation. *Leukemia* 2000; **14**: 1621–1629.
29 Tosi S, Ballabio E, Teigler-Schlegel A, Boultwood J, Bruch J, Harbott J. Characterization of 6q abnormalities in childhood acute myeloid leukemia and identification of a novel t(6;11)(q24.1;p15.5) resulting in a NUP98-C6orf80 fusion in a case of acute megakaryoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; **44** (3): 225–232.
30 Hussey DJ, Nicola M, Moore S, Peters GB, Dobrovic A. The (4;11)(q21;p15) translocation fuses the NUP98 and RAP1GDS1 genes and is recurrent in T-cell acute lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 2072–2079.
31 Mecucci C, La Starza R, Negrini M, Sabbioni S, Crescenzi B, Leoni P *et al.* t(4;11)(q21;p15) translocation involving NUP98 and RAP1GDS1 genes: characterization of a new subset of T acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2000; **109**: 788–793.
32 Lahortiga I, Vizmanos JL, Agirre X, Vazquez I, Cigudosa JC, Larrayoz MJ *et al.* NUP98 is fused to adducin 3 in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia and myeloid markers, with a new translocation t(10;11)(q25;p15). *Cancer Res* 2003; **63**: 3079–3083.
33 Griffis ER, Altan N, Lippincott-Schwartz J, Powers MA. Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 1282–1297.
34 Griffis ER, Xu S, Powers MA. Nup98 localizes to both nuclear and cytoplasmic sides of the nuclear pore and binds to two distinct nucleoporin subcomplexes. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 600–610.
35 Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Rout MP. Cleave to leave: structural insights into the dynamic organization of the nuclear pore complex. *Mol Cell* 2002; **10**: 221–223.
36 Kasper LH, Brindle PK, Schnabel CA, Pritchard CE, Cleary ML, van Deursen JM. CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 764–776.
37 Romana SP, Le Coniat M, Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; **9**: 186–191.
38 Nebral K, Konig M, Schmidt HH, Lutz D, Sperr WR, Kalwak K *et al.* Screening for NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies by fluorescence *in situ* hybridization. *Haematologica* 2005; **90**: 746–752.
39 Takeshita A, Naito K, Shinjo K, Sahara N, Matsui H, Ohnishi K *et al.* Deletion 6p23 and add(11)(p15) leading to NUP98 translocation in a case of therapy-related atypical chronic myelocytic leukemia transforming to acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; **152**: 56–60.
40 Sato Y, Abe S, Mise K, Sasaki M, Kamada N, Kouda K *et al.* Reciprocal translocation involving the short arms of chromosomes 7 and 11, t(7p−;11p+), associated with myeloid leukemia with maturation. *Blood* 1987; **70**: 1654–1658.
41 Kwong YL, Liu HW, Chan LC. Racial predisposition to translocation (7;11). *Leukemia* 1992; **6**: 232.
42 Huang SY, Tang JL, Liang YJ, Wang CH, Chen YC, Tien HF. Clinical, haematological and molecular studies in patients with chromosome translocation t(7;11): a study of four Chinese patients in Taiwan. *Br J Haematol* 1997; **96**: 682–687.
43 Kwong YL, Pang A. Low frequency of rearrangements of the homeobox gene HOXA9/t(7;11) in adult acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **25**: 70–74.
44 Nishiyama M, Arai Y, Tsunematsu Y, Kobayashi H, Asami K, Yabe M *et al.* 11p15 translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **26**: 215–220.
45 Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS *et al.* Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 12223–12227.
46 Giampaolo A, Pelosi E, Valtieri M, Montesoro E, Sterpetti P, Samoggia P *et al.* HOXB gene expression and function in differentiating purified hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 1995; **13**: 90–105.
47 Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 1999; **13**: 687–698.
48 Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ, Humphries RK. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol* 2002; **30**: 49–57.
49 Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *Embo J* 2001; **20**: 350–361.
50 Lin YW, Slape C, Zhang Z, Aplan PD. NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia. *Blood* 2005; **106**: 287–295.
51 Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T *et al.* Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nat Genet* 2002; **30**: 365–366.
52 Stec I, Wright TJ, van Ommen GJ, de Boer PA, van Haeringen A, Moorman AF *et al.* WHSC1, a 90 kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a Drosophila dysmorphy gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma [published erratum appears in Hum Mol Genet 1998 Sep;**7**(9):1527]. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 1071–1082.
53 Chuang TH, Xu X, Quilliam LA, Bokoch GM. SmgGDS stabilizes nucleotide-bound and -free forms of the Rac1 GTP-binding protein and stimulates GTP/GDP exchange through a substituted enzyme mechanism. *Biochem J* 1994; **303**: 761–767.
54 Suzuki A, Ito Y, Sashida G, Honda S, Katagiri T, Fujino T *et al.* t(7;11)(p15;p15) Chronic myeloid leukaemia developed into blastic transformation showing a novel NUP98/HOXA11 fusion. *Br J Haematol* 2002; **116**: 170–172.
55 Taketani T, Taki T, Ono R, Kobayashi Y, Ida K, Hayashi Y. The chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in acute myeloid leukemia results in fusion of the NUP98 gene with a HOXA cluster gene, HOXA13, but not HOXA9. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **34**: 437–443.
56 Fujimura T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Kawakubo K, Iwabuchi A, Kodama A *et al.* Two additional cases of acute myeloid leukemia with t(7;11)(p15;p15) having low neutrophil alkaline phosphatase scores. *Cancer Genet Cytogenet* 993; **68**: 143–146.
57 Hatano Y, Miura I, Nakamura T, Yamazaki Y, Takahashi N, Miura AB. Molecular heterogeneity of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in myelodysplastic syndromes associated with t(7;11)(p15;p15). *Br J Haematol* 1999; **107**: 600–604.
58 Morris CM, Fitzgerald PH, Kennedy MA, Hollings PE, Garry M, Corbett GM. HRAS1 and INS genes are relocated but not structurally altered as a result of the t(7;11)(p15;p15) in a clone from a patient with acute myeloid leukaemia (M4). *Br J Haematol* 1989; **71**: 481–486.
59 Ahuja HG, Popplewell L, Tcheurekdjian L, Slovak ML. NUP98 gene rearrangements and the clonal evolution of chronic myelogenous leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; **30**: 410–415.
60 Wong KF, So CC, Kwong YL. Chronic myelomonocytic leukemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98/HOXA9 fusion. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; **115**: 70–72.
61 Gu BW, Wang Q, Wang JM, Xue YQ, Fang J, Wong KF *et al.* Major form of NUP98/HOXC11 fusion in adult AML with t(11;12)(p15;q13) translocation exhibits aberrant trans-regulatory activity. *Leukemia* 2003; **17**: 1858–1864.

62 Panagopoulos I, Isaksson M, Billstrom R, Strombeck B, Mitelman F, Johansson B. Fusion of the NUP98 gene and the homeobox gene HOXC13 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer* 2003; **36**: 107–112.
63 La Starza R, Trubia M, Crescenzi B, Matteucci C, Negrini M, Martelli MF *et al*. Human homeobox gene HOXC13 is the partner of NUP98 in adult acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer* 2003; **36**: 420–423.
64 Shimada H, Arai Y, Sekiguchi S, Ishii T, Tanitsu S, Sasaki M. Generation of the NUP98-HOXD13 fusion transcript by a rare translocation, t(2;11)(q31;p15), in a case of infant leukaemia. *Br J Haematol* 2000; **110**: 210–213.
65 Jaju RJ, Haas OA, Neat M, Harbott J, Saha V, Boultwood J *et al*. A new recurrent translocation, t(5;11)(q35;p15.5), associated with del(5q) in childhood acute myeloid leukemia. The UK Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Blood* 1999; **94**: 773–780.
66 Cerveira N, Correia C, Doria S, Bizarro S, Rocha P, Gomes P *et al*. Frequency of NUP98-NSD1 fusion transcript in childhood acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2003.
67 Cimino G, Sprovieri T, Rapanotti MC, Foa R, Mecucci C, Mandelli F. Molecular evaluation of the NUP98/RAP1GDS1 gene frequency in adults with T-acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2001; **86**: 436–437.

Appendix

The Appendix lists the name of the institute, with the center and number of cases in parentheses, followed by the names of other participants. CHU Toulouse (Toulouse; $n=12$): Eliane Duchayne, Cécile Demur, Blandine Roquefeuil, Alain Robert, Françoise Huguet, Christian Recher; CHU Nantes (Nantes; $n=9$); Hôpital Haut Lévêque (Bordeaux; $n=7$): Yves Perel, Arnaud Pigneux; CHU Dijon (Dijon; $n=6$): Patrick Callier, Bernardine Favre-Audry, Marc Maynadie, Denis Caillot; Institut Paoli Calmettes (Marseille; $n=4$): Danielle Sainty, Christine Arnoulet, Norbert Vey, Diane Coso, Aude Charbonnier; Hopital Jeanne de Flandre (Lille; $n=4$); CH Versailles (Versailles; $n=4$): Isabelle Garcia, Sylvie Castaigne; Institut de Pathologie et Genetique (Gerpinnes, Belgium; $n=3$): P Vannuffel, A Delannoy, M Andre, P Mineur; CHU Reims (Reims; $n=3$) Chantal Himberlin et Sylvie Daliphard; CHU Hôpital Nord (St Etienne, $n=3$); Groupe Hospitalier Pitié-Salpétrière (Paris; $n=2$): J.Ong; CHU St Antoine (Paris; $n=2$); CH Chambéry (Chambéry; $n=2$); Hôpital Universitaire de Genève (Genève, Switzerland; $n=2$): Claudine Helg, CHU St Louis (Paris; $n=1$), Hôpital E.Herriot (Lyon, $n=1$); Cliniques Universitaires StLuc (Bruxelles, Belgium: $n=1$)

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Leukemia, Apr;20(4):696-706, copyright (2006)

B. Article 2

NUP98-NSD1 fusion by insertion in acute myeloblastic leukemia.

Petit A, Radford I, Waill MC, Romana S, Berger R. Cancer Genet Cytogenet. 2008 Jan 1;180(1):43-6.

Certaines translocations, survenant dans les régions sub-télomériques des chromosomes, sont difficiles à visualiser par les techniques de caryotype standard. Ces translocations à caryotype normal sont dites « cryptiques ». Leur identification nécessite d'autres méthodes d'exploration, comme la technique de FISH (fluorescent in situ hybridization).

Par ailleurs, certaines fusions peuvent avoir des présentations cytogénétiques différentes.

La translocation t(5;11)(q35;p15.4), résultant de la fusion du gène *NUP98* et du gène *NSD1*, a été initialement décrite comme une translocation cryptique, ou associée à une délétion du bras long du chromosome 5.

L'étude du caryotype médullaire de ce patient de 4 ans, traité pour une LAM-M2, montrait plusieurs anomalies : 46,XY,add(5)(q35),del(9)(q22q32),del(11)(p13). Par l'utilisation de la technique de FISH, j'ai pu mettre en évidence, une fusion *NUP98-NSD1* originale. Le gène *NUP98*, situé nativement en 11p15, est transloqué et inséré au locus de *NSD1* sur le chromosome 5, en interrompant ce gène.

Cette description apporte une information sur un mécanisme de fusion différent, permettant d'optimiser l'identification de telles anomalies cytogénétiques impliquant le gène *NUP98*.

ELSEVIER

Cancer Genetics and Cytogenetics 180 (2008) 43–46

CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS

Short communication

NUP98–NSD1 fusion by insertion in acute myeloblastic leukemia

Arnaud Petit[a,b], Isabelle Radford[a,b,c], Marie-Christine Waill[c], Serge Romana[a,b,c,*], Roland Berger[a,b]

[a]*National Institute of Health and Medical Research (INSERM), EMI 0210, Necker Pediatric Hospital, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France*
[b]*Federated Research Institute–Necker Pediatric Hospital (IRNEM), University of Paris V, Paris, France*
[c]*Cytogenetics Laboratory, Necker Pediatric Hospital, Paris, France*

Received 8 August 2007; accepted 7 September 2007

Abstract A case of *NUP98–NSD1* gene fusion resulting from the insertion of a subtelomeric part of chromosome 11p15.4 within the subtelomeric part of 5q35 was detected in a child with acute myeloblastic leukemia. This new case illustrates the importance of using fluorescence in situ hybridization followed by reverse transcriptase–polymerase chain reaction techniques to detect abnormalities involving subtelomeric chromosomal regions. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The promiscuous gene *NUP98*, which encodes a 98-kD protein of the nucleoporin complex, is fused to at least 21 different fusion gene partners in chromosomal rearrangements seen in various hematopoietic disorders [1,2]. The *NUP98* 11p15.4, at 3,6 Mb of the telomere of the short arm of chromosome 11. Gene fusions resulting from cryptic translocations involving the *NUP98* locus and another partner gene can be expected from this chromosomal localization. Translocation t(5;11)(q35;p15.4), resulting in gene fusion of *NUP98* and *NSD1*, was initially described as a cryptic translocation associated with deletion of the chromosome 5 long arm occurring in de novo childhood acute myeloid leukemia [3]. Other karyotypic abnormalities, however, may be associated with *NUP98–NSD1* gene fusion. The case reported here illustrates the variety of chromosome abnormalities that may be associated with this gene rearrangement.

2. Case report

A 4-year-old boy was admitted in June 1997 to the pediatric hematology department of the Saint-Louis Hospital (Paris, France) for diagnosis and treatment of acute leukemia discovered on the basis of blood abnormalities detected for unexplained asthenia and weight loss. Hematological data included white blood cell count of 3.4×10^9/L with 12% blast cells. Bone marrow was hypercellular with 32% hemoblasts, 1% promyelocytes, 2% myelocytes, 7% metamyelocytes, 5% neutrophil polymorphonuclears, 1% eosinophils, 3% monocytes,8% lymphocytes, and 41% erythroblastic cells, with presence of abnormal megakaryocytes. The diagnosis was acute myeloblastic leukemia, AML-M2 in the French–American–British nomenclature, with abnormalities of erythroblastic and megakaryocytic lineages (AML with maturation and multilineage dysplasia). The karyotype, based on 24- and 48-hour bone marrow and blood cultures, was 46,XY,add(5)(q35),del(9)(q22q32), del(11)(p13)[14]/46,XY[4] (Fig. 1A).

Complete remission was achieved in October 1997 with polychemotherapy, but in December 1997 bone marrow examination showed 4% blast cells. The banded karyotype from 24- and 48-hour bone marrow cultures was 46,XY, add(5)(q35),del(9)(q22q32),del(11)(p13)[9]/46,XY[22]. In February and March 1998, the bone marrow was still abnormal, with 22% blast cells, 16% cells of granulocytic lineage, presence of megakaryocytes, and 28% erythroblastic cells.

3. Materials and methods

Fluorescence in situ hybridization (FISH) with whole chromosome 11 painting probes (Qbiogene, Illkirch, France) showed a chromosome 11 insertion within the q35 band of chromosome 5 (Fig. 1B). Because of the chromosomal localization of the insertion and the 11p deletion detected by conventional cytogenetic study, we hypothesized that the chromosome 11 insert in the chromosome 5

* Corresponding author. Tel.: +33(0)-1-42.19.26.33; fax: +33(0)-1-.42.19.27.40.
E-mail address: serge.romana@nck.aphp.fr (S. Romana).

0165-4608/08/$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cancergencyto.2007.09.007

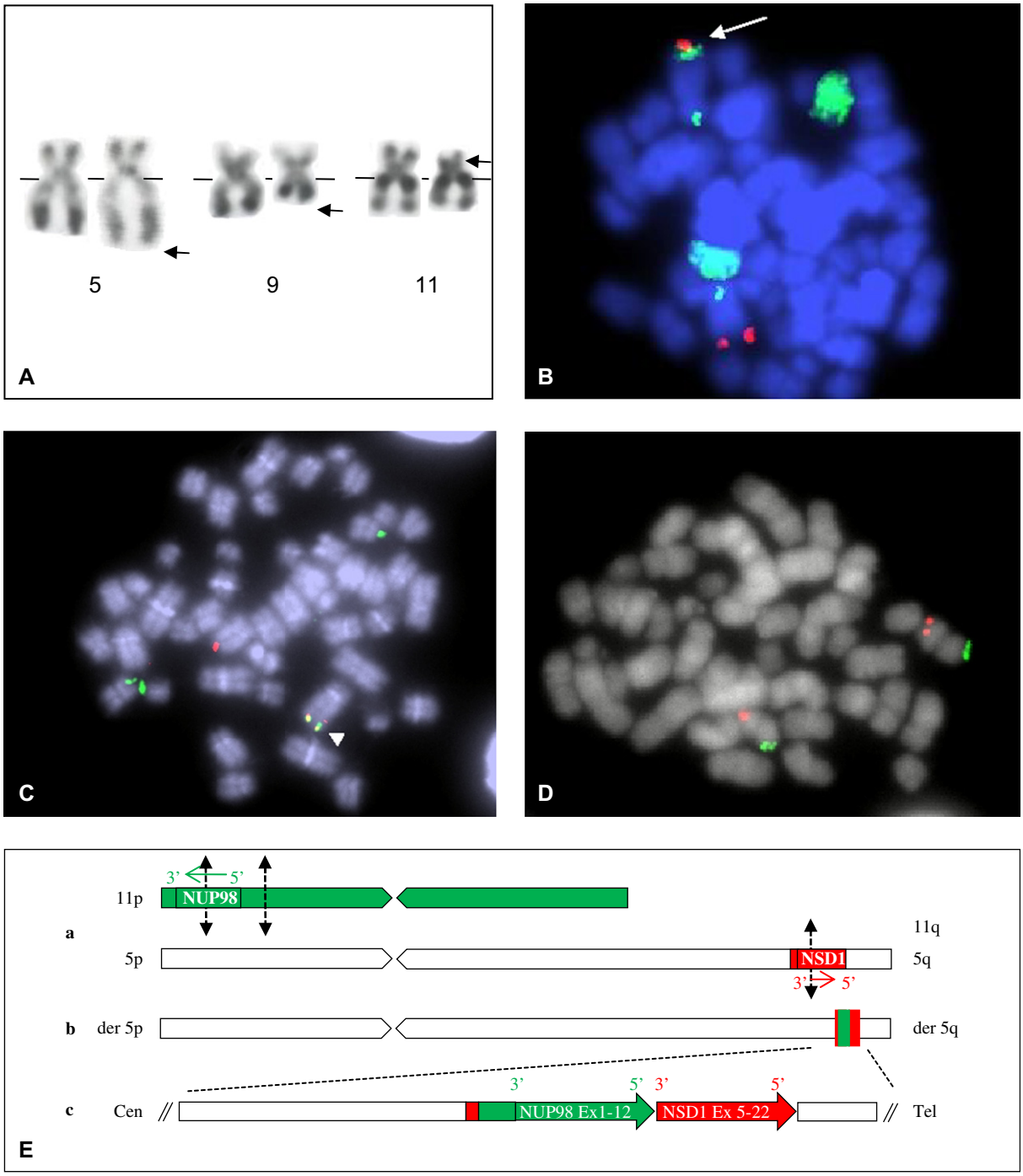


Fig. 1. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization (FISH) studies. (A) Partial karyotype, R-banding. Arrows indicate the rearranged chromosomes 5, 9, and 11. (B) FISH with whole chromosome 5 (*green*) and 11 (*red*). The insertion within 5q is visualized by superimposition of green and red signals (*yellow*). (C) Hybridization with bacterial artificial chromosomes RP11-120E20 and RP11-258P13 (*green*) covering *NUP98* and RP11-99N22 (*red*) covering *NSD1* shows two normal signals on nonrearranged chromosomes 11 and 5, one signal on der(11), and cohybridization signal on der(5). The absence of cohybridization signal on der(11) is concordant with the insertion of part of *NUP98* within der(5). (D) Normal localization of specific subtelomeric probes on 11p and 11q. (E) Schema of the (5;11) rearrangement. (a) Chromosome 11 (*green*) with locus *NUP98* and chromosome 5 with *NSD1* locus (*red*). Green arrows indicate the direction of gene transcription; black arrows indicate the hypothetic breakpoints. (b) Derivative chromosome 5 with *NUP98–NSD1* fusion. (c) Enlargement of 5q35 region on derivative chromosome.

originated from 11p and that this chromosomal abnormality could involve the *NUP98* and *NSD1* genes. To test this hypothesis, we performed dual FISH experiments with bacterial artificial chromosome (BAC) clones RP11-120E20 and RP11-258P13 covering the *NUP98* gene and RP11-9N22 spanning the *NSD1* locus (BACPAC Resources Center, Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA), with usual techniques [4]. We observed only one

NSD1 signal located on the nonrearranged chromosome 5 and three *NUP98* signals, one on the nonrearranged chromosome 11, another on the deleted 11p, and a third colocalizing with the *NSD1* probe signal on the rearranged chromosome 5 (Fig. 1C). This indicated the existence of a *NUP98–NSD1* or a *NSD1–NUP98* fusion.

Next, we performed reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments, with primers and techniques as defined previously [5]. A specific transcript *NUP98–NSD1* was amplified, without amplification of a reciprocal transcript *NSD1–NUP98*. Its sequence showed the usual in-frame fusion between *NUP98* exon 12 and *NSD1* exon 5 (Fig. 2). This suggests that, contrary to the classical *NUP98–NSD1* fusion coding from the der(11) of the t(5;11)(q35;p15) translocation, the *NUP98–NSD1* found in our patient was generated by an inverted insertion of a part of the chromosomal 11 small arm with the telomeric breakpoint located in intron 11 of *NUP98* gene. This was confirmed by FISH experiments with telomeric 11p and 11q probes, which showed a normal localization of the two probes on both chromosomes 11 (Fig. 1D).

3. Discussion

We report the case of a child with acute myeloblastic leukemia and rearranged karyotype involving add(5)(q35), del(9)(q22q32), and del(11)(p13). FISH analysis experiments showed that the abnormalities of chromosomes 5 and 11 were due to an insertion of the distal part of 11p within band 5q35 that generated an *NUP98–NSD1* fusion gene encoded by the der(5). Due to the orientation of the two genes 5′ centromere–3′ telomere and their localization to the short arm of 11 and long arm of 5, respectively, the segment had to be inverted to allow in-frame fusion of the two rearranged genes, as shown by PCR analysis (Fig. 1E).

Another insertion producing two in-frame chimeric transcripts NUP98–NSD1 in a patient with refractory anemia with excess of blasts has been reported [6]. In that case the *NUP98* segment was also inserted into the *NSD1* locus, but the banded karyotype showed add(11)(p15), thus demonstrating *NUP98* involvement. Insertions, however, are not the most common mechanisms of *NUP98–NSD1* gene fusion. Some are associated with cryptic translocations with apparently normal karyotypes [7,8], others with apparent 5q− [5,9–11]. It is thus now clear that various karyotypes may be associated with the *NUP98–NSD1* gene fusion (Table 1). Similarly, the types of hematopoietic disorders associated with the fusion also are diverse (i.e., AML with maturation more often than AML without maturation, acute myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndrome, and acute biphenotypic leukemia). The abnormality more usually occurs in children than in adults and involves de novo disorders. Because the prognostic value of the

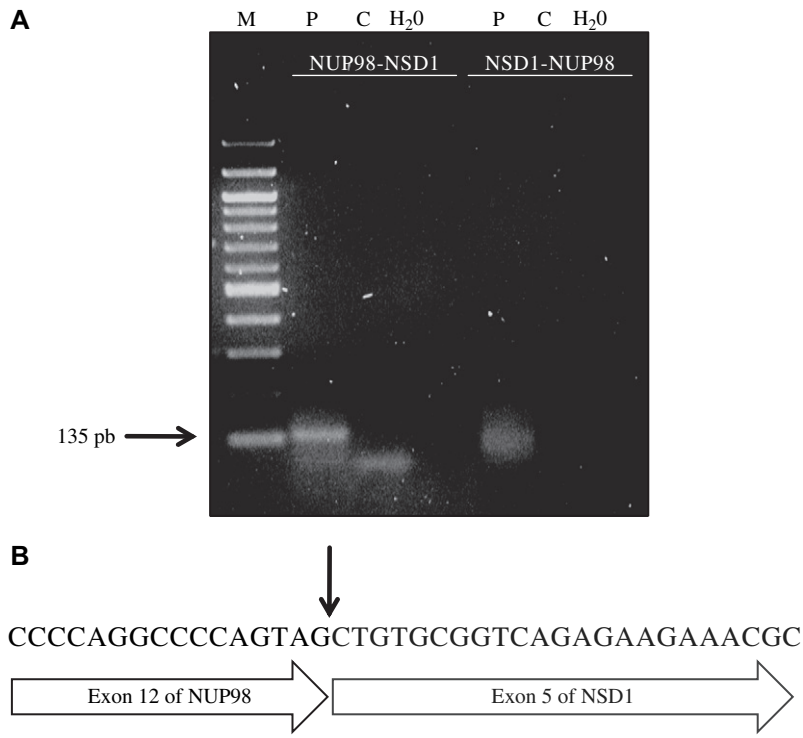


Fig. 2. *NUP98–NSD1* transcript. (A) A specific 135-pb *NUP98–NSD1* product is detected in bone marrow of the patient (P) at diagnosis by RT-PCR. No amplification of reciprocal product *NSD1–NUP98*. C is a control with cDNA of human cell line MO7E and M is a 100-bp DNA ladder (Fermentas International, Burlington, ON, Canada). (B) Partial nucleotide sequence of *NUP98–NSD1* transcript shows in-frame fusion joining nucleotide 1749 of *NUP98* to nucleotide 3797 of *NSD1*. The Ensembl transcript ID ENST00000359171 for *NUP98* and ENST00000355783 for *NSD1* (http://www.ensembl.org).

Table 1
Cases with *NUP98–NSD1* chimeric fusion

Case	Sex	Age, yr	Diagnosis	Standard karyotype abnormalities	Chimeric fusion transcript		*NUP98–NSD1* breakpoint localization		References
					NUP98–NSD1	NSD1–NUP98	*NUP98*	*NSD1*	
1	M	12	AML-M2	del5q	+	+	Exon 12	Exon 5	Jaju et al., 2001 [5]
2	F	18	AML-M1	none	+	+	Exon 12	Exon 5	Brown et al., 2002 [7]
3	M	5	ALM-M2	none	+	+	Exon 12	Exon 5	Brown et al., 2002 [7]
4	F	14	AML-M1	none	not done	not done	Exon 12[a]	—	Panarello et al., 2002 [11]
5	F	4	AML-M2	del5q	+	–	Exon 12[b]	Exon 5[b]	Cerveira et al., 2003 [9]
6	M	65	RAEB	add(11)(p15)	+	–	Exon 11/12	Exon 5	La Starza et al., 2004 [6]
7	F	3	AML-M2	del(11)(p13)	+	–	Exon 12	Exon 5	Nebral et al., 2005 [10]
8	M	4	AML-M2	add(5)(q35), del(9)(q22q32), del(11)(p13)	+	–	Exon 12	Exon 5	Present case

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; F, female; M, male; RAEB, refractory anemia with excess blasts.
[a] By FISH only.
[b] The transcript products were not sequenced.

NUP98–NSD1 fusion remains to be ascertained, it is important to recognize the abnormality in hematopoietic malignancies, despite its low frequency [9].

The *NSD1* gene (nuclear binding set-domain protein gene 1) is localized 4 Mb proximal to the 5q telomere and is known to be involved in two genetic disorders: Sotos syndrome (cerebral gigantism, MIM #117550) and Weaver syndrome (MIM #277590). It codes for the nuclear receptor binding SET protein (NSD1), which is a histone methyltransferase. The *NUP98–NSD1* fusion codes for a chimeric protein containing the N-terminal FG NUP98 domain and the NSD1 C-terminal SET domain. Wang et al. [12] recently showed that the *NUP98–NSD1* fusion prevents repression of physiologic expression of the *HOXA* gene locus by an epigenetic process. The biological consequences of the *NUP98–NSD1* fusion need to be studied further, particularly considering specific treatment of the associated diseases.

Acknowledgments

Technical assistance by Maryvonne Busson-Le Coniat is gratefully acknowledged.

References

[1] Kobzev YN, Martinez-Climent J, Lee S, Chen J, Rowley JD. Analysis of translocations that involve the *NUP98* gene in patients with 11p15 chromosomal rearrangements. Genes Chromosomes Cancer 2004;41:339–52.

[2] Romana SP, Radford-Weiss I, Ben Abdelali R, Schluth C, Petit A, Dastugue N, Talmant P, Bilhou-Nabera C, Mugneret F, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Andrieu J, Lai JL, Terre C, Rack K, Cornillet-Lefebvre P, Luquet I, Nadal N, Nguyen-Khac F, Perot C, Van den Akker J, Fert-Ferrer S, Cabrol C, Charrin C, Tigaud I, Poirel H, Vekemans M, Bernard OA, Berger R, Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies: a study of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. Leukemia 2006;20:696–706.

[3] Jaju RJ, Haas OA, Neat M, Harbott J, Saha V, Boultwood J, Brown JM, Pirc-Danoewinata H, Krings BW, Müller U, Morris SW, Wainscoat JS, Kearney L, the UK Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). A new recurrent translocation, t(5;11)(q35;p15.5), associated with del(5q) in childhood acute myeloid leukemia. Blood 1999;94:773–80.

[4] Cherif D, Romana S, Der-Sarkissian H, Jones C, Berger R. Chromosome painting in acute monocytic leukemia. Genes Chromosomes Cancer 1993;6:107–12.

[5] Jaju RJ, Fidler C, Haas OA, Strickson AJ, Watkins F, Clark K, Cross NC, Cheng JF, Aplan PD, Kearney L, Boultwood J, Wainscoat JS. A novel gene, *NSD1*, is fused to *NUP98* in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia. Blood 2001;98:1264–7.

[6] La Starza R, Gorello P, Rosati R, Riezzo A, Veronese A, Ferrazzi E, Martelli MF, Negrini M, Mecucci C. Cryptic insertion producing two *NUP98/NSD1* chimeric transcripts in adult refractory anemia with an excess of blasts. Genes Chromosomes Cancer 2004;41:395–9.

[7] Brown J, Jawad M, Twigg SR, Saracoglu K, Sauerbrey A, Thomas AE, Eils R, Harbott J, Kearney L. A cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in 2 children with acute myeloid leukemia with apparently normal karyotypes, identified by a multiplex fluorescence in situ hybridization telomere assay. Blood 2002;99:2526–31.

[8] Casas S, Aventín A, Nomdedéu J, Sierra J. Cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in adult de novo acute myelocytic leukemia with normal karyotype. Cancer Genet Cytogenet 2003;145:183.

[9] Cerveira N, Correia C, Dória S, Bizarro S, Rocha P, Gomes P, Torres L, Norton L, Borges BS, Castedo S, Teixeira MR. Frequency of *NUP98–NSD1* fusion transcript in childhood acute myeloid leukaemia. Leukemia 2003;17:2244–7.

[10] Nebral K, König M, Schmidt HH, Lutz D, Sperr WR, Kalwak K, Brugger S, Dworzak MN, Haas OA, Strehl S. Screening for *NUP98* rearrangements in hematopoietic malignancies by fluorescence in situ hybridization. Haematologica 2005;90:746–52.

[11] Panarello C, Rosanda C, Morerio C. Cryptic translocation t(5;11)(q35;p15.5) with involvement of the *NSD1* and *NUP98* genes without 5q deletion in childhood acute myeloid leukemia. Genes Chromosomes Cancer 2002;35:277–81.

[12] Wang GG, Cai L, Pasillas MP, Kamps MP. NUP98–NSD1 links H3K36 methylation to *Hox-A* gene activation and leukaemogenesis. Nat Cell Biol 2007;9:804–12.

Reprinted from Cancer Genet Cytogenet, 180(1), Petit A, Radford I, Waill MC, Romana S, Berger R, NUP98-NSD1 fusion by insertion in acute myeloblastic leukemia, Pages 43-6, Copyright (2008), with permission from Elsevier.

C. Article 3

NUP98-HMGB3, a novel oncogene fusion.

Arnaud Petit, Christine Ragu, Véronique Della-Valle, Marina Lafage-Pochitaloff, Gwendoline Soler, Caroline Schluth, Isabelle Radford, Chris Ottolenghi, Olivier A Bernard, Virginie Penard-Lacronique and Serge P Romana. Leukemia. 2010 Mar;24(3):654-8

L'étude de la translocation t(X;11)(q28 ;p15) a permis l'identification d'un nouveau partenaire, le gène *HMGB3*. HMGB3 appartient à la famille des « High Mobility Group » protéines, qui sont des protéines de la chromatine non histones, capables de lier l'ADN. Chez la souris, *Hmgb3* intervient dans la différenciation hématopoïétique et dans le destin des cellules souches hématopoïétiques.

J'ai étudié le pouvoir oncogénique de la fusion *NUP98-HMGB3* par une double approche.

Des progéniteurs hématopoïétiques (Lin-), ont été infectés par transduction rétrovirale d'un vecteur MSCV-IRES-GFP contenant la fusion *NUP98-HMGB3*. Les tests clonogéniques ont montré un faible pouvoir transformant *in vitro*, des progéniteurs transduits par la fusion.

Ces mêmes progéniteurs, greffés par injection rétro-orbitale, chez la souris irradiée léthalement, ont montré leur capacité hautement transformante, par induction de syndromes myéloprolifératifs (MDP-like leukemia, selon la classification de Bethesda), rapidement mortels (médiane 112 jours), transplantables chez des receveurs secondaires, développant la même maladie avec une médiane de 80 jours. À titre de comparaison, la fusion *Nup98-HOXA9* induit un syndrome myéloprolifératif avec une médiane d'environ 200 jours [120-400].

L'étude du modèle *Nup98-Hoxa9* a démontré que les leucémies induites étaient associées à une surexpression des gènes *Hoxa*, en particulier d'*Hoxa9*. Pour vérifier si la fusion *NUP98-HMGB3*, dérégulait les mêmes cibles, j'ai entrepris une étude de l'expression des gènes *Hoxa5, Hoxa7, Hoxa9, Hoxa10* et des cofacteurs *Meis1, Pbx1* et *Pbx2* sur les échantillons médullaires des souris malades. Cette expression a été comparée à des échantillons leucémiques de souris exprimant la fusion *Nup98-Hoxa9*. Les blastes exprimant le transcrit *NUP98-HMGB3* expriment, plus faiblement *Hoxa9* que ceux ayant la fusion *Nup98-HoxaA9*. Par ailleurs, il n'y a pas de surexpression *Meis1*, suggérant que la transformation, induite par cette fusion, n'entraine pas la dérégulation de l'activité canonique Hoxa-Meis.

Leukemia (2009), 1–4
© 2009 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0887-6924/09 $32.00
www.nature.com/leu

LETTER TO THE EDITOR

NUP98–HMGB3: a novel oncogenic fusion

Leukemia advance online publication, 3 December 2009;
doi:10.1038/leu.2009.241

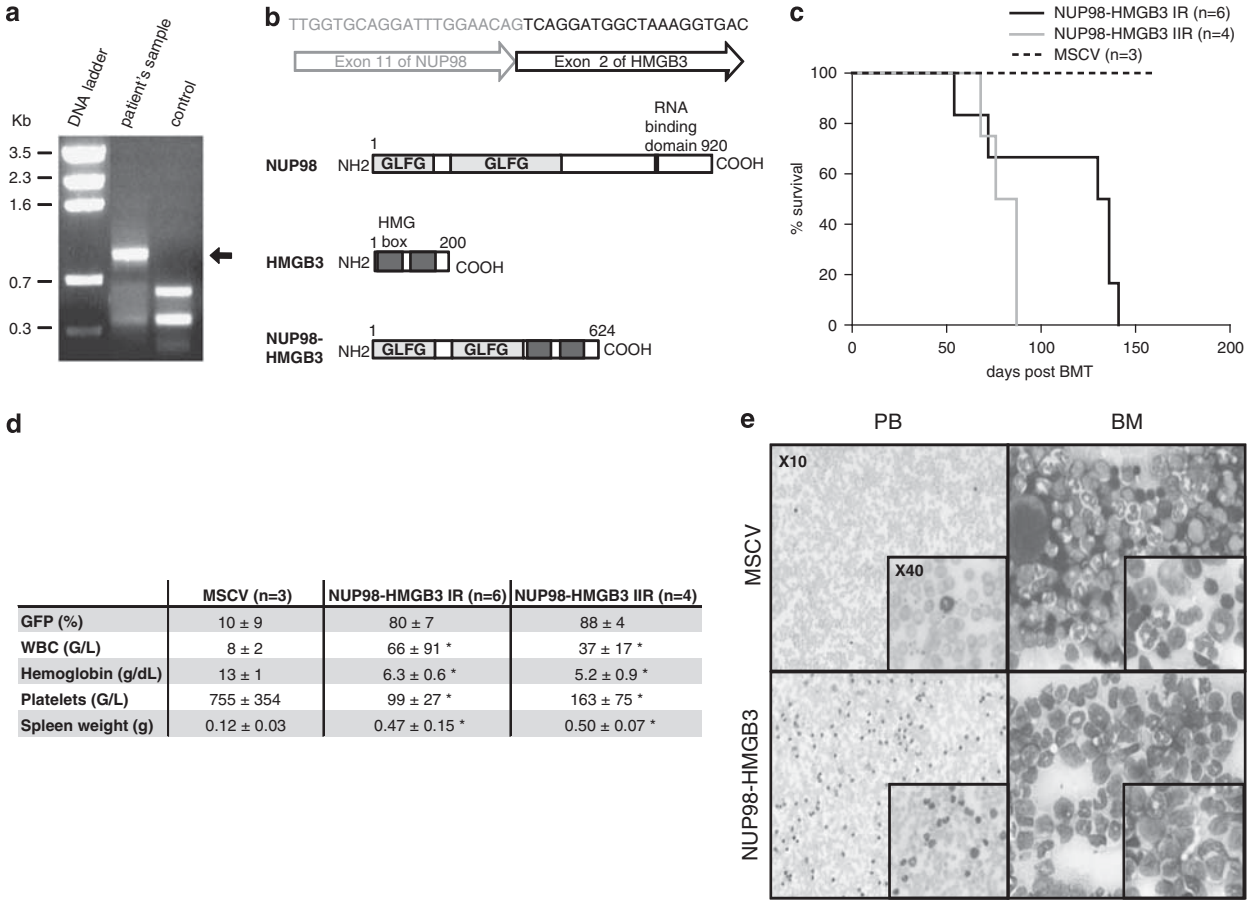
NUP98 is a promiscuous gene involved in chromosomal aberrations with more than 20 different partner genes in a variety of human hematological malignancies.[1,2] These rearrangements all lead to the expression of hybrid proteins that start with the amino-terminal moiety of NUP98. This amino-terminal domain contains multiple copies of a glycine-leucine-phenylalanine-glycine core motif, known to recruit the CBP/p300 acetyltransferases.[3] Evidence from overexpressions studies in mouse bone marrow (BM) progenitors indicates that the NUP98-fusion proteins induce leukemic transformation through the upregulation of *Hoxa* genes and the Hox cofactor *Meis1*. Expression of *Hoxa*, most frequently *Hoxa7*, *Hoxa9* and *Hoxa10* is postulated to induce a self-renewal stem cell-like program that likely contributes to the leukemic process.[4,5]

High mobility group (HMG) proteins are non-histone chromatin-associated proteins that bind to DNA with limited or no sequence specificity. Among them, HMGB proteins are important architectural facilitators of nucleosome remodelling and possibly of transcription factor's interaction with DNA (for a review, see Travers[6]). The expression of the murine *Hmgb3* gene is tightly regulated during hematopoiesis and is required in early steps of hematopoietic stem cell development in which it regulates cell-fate decisions. It is expressed in common myeloid and lymphoid progenitors (CMP and CLP) and except in the erythroid cells, it must be downregulated for the proper differentiation of both lineages to take place.[7,8] *Hmgb3* RNA has recently been found to be part of an embryonic stem cell-like transcription signature that was defined in mouse models of mixed-lineage leukemia (MLL)-mediated leukemic transformation and was also reported to be transiently upregulated during myeloid differentiation.[9]

We earlier reported the involvement of *NUP98* in t(X;11)(q28;p15) in a 73-year-old woman with therapy-related acute myeloblastic leukemia (AML) with M4 subtype.[1] Fluorescence *in situ* hybridization experiments performed on metaphasic chromosome of the blast cells permitted the mapping of the translocation breakpoint on Xq28 in which only the *HMGB3* gene had the correct transcription orientation (telomere to centromere) that would allow an in-frame fusion to *NUP98* (assuming a simple translocation event). Reverse transcriptase-PCR using primers located within *NUP98* and *HMGB3* exons showed the presence of *NUP98–HMGB3* fusion transcript from patient's material and not from control complementary DNA (cDNA) (Figure 1a). Nucleotide sequence analyses of the fragment revealed an in-frame fusion of the exon 11 of *NUP98* to the exon 2 of *HMGB3* (Figure 1b). No reciprocal *HMGB3–NUP98* transcript could be detected (not show). The NUP98–HMGB3 predicted protein is composed of the first 422 amino acids of NUP98 fused to the entire *HMGB3* coding sequence, (Figure 1b). Indeed, in the normal *HMGB3* transcript, the first coding ATG codon is located in exon 2 after a short untranslated sequence. In the fusion transcript, these nucleotides accommodate a continuous reading frame from exon 11 of *NUP98* through *HMGB3*.

To establish the transforming properties of the *NUP98–HMGB3* fusion, murine primary BM hematopoietic progenitors were transduced with a retroviral vector murine stem cell virus (MSCV) co-expressing the *NUP98–HMGB3* fusion cDNA and the green fluorescent protein (GFP), a MSCV–*NUP98–HOXA9* used as a reference or the empty MSCV alone as negative control. Viral supernatants were obtained as described.[10] Transduced cells were split in two and one-half was seeded in methylcellulose medium for serial replating assays. We observed that *NUP98–HMGB3*-transduced progenitors formed moderate numbers of colonies (90% GFP^+) until but not beyond the third round of replating (not shown). Cells transduced with *NUP98–HOXA9* grew beyond five replating, whereas for empty vector-transduced cells, no colony was observed after the second replating. This indicates that NUP98–HMGB3 is a weak oncogene *in vitro*. The other half of *NUP98–HMGB3*-transduced cells was engrafted into sub-lethally irradiated mice. Mice transplanted with progenitors transduced with the empty MSCV ($n=3$) remained free of hematological disease up to 12 months after transplantation. Mice engrafted with progenitors transduced with the *NUP98–HOXA9* fusion developed a myeloproliferative disease (MPD) that progressed to AML with long latency ($n=2$; median 250 days) consistent with previous reports[11] (not shown). Mice that received *NUP98–HMGB3*-transduced cells ($n=6$) rapidly died with a median survival of 112 days (range, 60–140 days) (Figure 1c). They developed hyperleucocytosis, anemia with mucous paleness and dyspnea, thrombopenia and splenomegaly (Figure 1d). Femurs of NUP98–HMGB3 mice were conspicuously discolored reflecting a block in terminal erythropoiesis, as confirmed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) quantitative analyses performed on BM erythroid progenitors (not shown). BM smears from femurs showed cytological abnormalities that affected immature and mature myeloid cells, suggesting a MPD-like leukemia according to the Bethesda classification[12] (Figure 1e). In agreement, when compared with control mice, FACS analysis of NUP98–HMGB3 hematopoietic organs showed an increased number of $GFP^+Gr1^+CD11b^+$ mature myeloid cells into the peripheral blood (PB), spleen and BM of sick mice (Figure 2a).

BM progenitor populations were analyzed by FACS (Figure 2b). The $Lin^-Sca1^-c\text{-}Kit^+CD34^+Fc\gamma RII/III^{high}$ subset, corresponding to the granulocyte-macrophage progenitors,[13] was markedly expanded in the BM of NUP98–HMGB3 mice compared with control mice. In contrast, the common myeloid progenitors (CMP) and megakaryocyte-erythroid progenitors (MEPs) populations were virtually absent (Figure 2b) indicating that *NUP98–HMGB3* expression is associated with preferential expansion of the myelo-monocytic lineages, as observed in several mouse models of MLL-induced leukemias.[14] The malignant nature of *NUP98–HMGB3*-induced hemopathy was further established by engraftment of primary MPD cells into secondary recipients. All engrafted mice developed an MPD-like leukemia of similar immunophenotype (not shown) with shorter latency than the primary disease (median survival time of



	MSCV (n=3)	NUP98-HMGB3 IR (n=6)	NUP98-HMGB3 IIR (n=4)
GFP (%)	10 ± 9	80 ± 7	88 ± 4
WBC (G/L)	8 ± 2	66 ± 91 *	37 ± 17 *
Hemoglobin (g/dL)	13 ± 1	6.3 ± 0.6 *	5.2 ± 0.9 *
Platelets (G/L)	755 ± 354	99 ± 27 *	163 ± 75 *
Spleen weight (g)	0.12 ± 0.03	0.47 ± 0.15 *	0.50 ± 0.07 *

Figure 1 Molecular breakpoint analysis of the t(X;11)(q28;p15) and bone marrow transplants (BMTs) using *NUP98–HMGB3*-transduced hematopoietic progenitors. (**a**) A specific *NUP98–HMGB3* product is detected by reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) in the patient's sample at diagnosis. PCR with primers located in *NUP98* exon 8 (5′-TTGGCCAACAGAATCAGCAGAC-3′) and *HMGB3* exon 5 (5′-CCGGGCAACTTTAG-CAGGAC-3′) yielded a 983-bp product. Control lane corresponds to the complementary DNA (cDNA) of the human malignant cell line MO7E. (**b**) Partial nucleotide sequence of the *NUP98–HMGB3* chimeric transcript shows that nucleotide 1609 (end of exon 11) of the *NUP98* gene and nucleotide 88 of *HMGB3* (that is, the start of *HMGB3* exon 2) are joined in frame. Schematic representation of the native and chimeric proteins, showing the glycine-leucine-phenylalanine-glycine (GLFG) repeats and RNA binding domain of NUP98 and the two high mobility group (HMG) boxes of HMGB3. (**c**) Kaplan–Meier survival plot of NUP98–HMGB3 recipients together with control (MSCV) mice. Primary recipients (NUP98–HMGB3 IR, $n=6$; MSCV, $n=3$) were obtained by the injection of 5×10^5 transduced Lin– cells into the retroorbital vein of sublethally irradiated mice. Animals were killed because of signs of disease between day 54 and 141 post-transplant. Secondary recipients (NUP98–HMGB3 IIR, $n=4$) were obtained by the engraftment of 10^6 bone marrow (BM) cells from primary mice (killed at day 54 post-transplant) into sublethally irradiated animals; they all died between day 68 and 87 post-BMT. (**d**) Hematological parameters of primary and secondary recipients. $^*P<0.05$ by Mann–Whitney test. (**e**) Cytological analysis of peripheral blood (PB) and BM cells, evaluated on May–Grünwald–Giemsa staining of smears and cytospin preparations respectively showed an over-representation of mature myeloid cells in the two tissues, associated with the disappearance of the erythroid and megakaryocytic compartments in the BM for primary NUP98–HMGB3 recipient mice compared with MSCV-transduced animals.

80 days) (Figure 1c). Taken together, these results show that NUP98–HMGB3 acts as an oncogene responsible for a rapid and transplantable MPD-like leukemia in recipient mice, which is associated with defects in the differentiation of myelo-monocytic cells.

Mouse models developed to analyze the oncogenic activity of MLL and NUP98 fusions showed the overexpression of *Hoxa9* and *Meis1* in blast cells;[4,5,15–18] in addition, *Hoxa9* and *Meis1* overexpression was associated with the emergence but not the maintenance of MLL leukemic stem cells.[9] We thus measured the expression levels of genes of the *Hoxa* cluster as well as the genes encoding for the HOX cofactors Meis1, Pbx1 and Pbx3 in BM cells from primary and secondary *NUP98–HMGB3* recipients. We compared these values to *NUP98–HOXA9* leukemic mice. Relative to *NUP98–HOXA9*, *NUP98–HMGB3* BM cells showed much weaker expression (approximately 10- to 90-fold) of *Hoxa5*, *Hoxa7* and *Hoxa9* (Figure 2c). In contrast, roughly similar transcription of *Hoxa10* was observed in all samples, whereas *Meis1* expression was detected only in *NUP98–HOXA9* leukemic cells and *Pbx3* transcripts levels were similarly upregulated in both leukemia models compared with control. As *NUP98–HMGB3*-expressing blast cells upregulate *Hoxa9* only weakly and retain wild-type levels of *Meis1*, we infer that transformation mediated by the fusion does not involve deregulated activity of the canonical *Hoxa–Meis1* pathway. These results suggest that several transformation pathways might be involved in the leukemogenic properties of NUP98 fusions. This would be consistent with recent work in mice. Indeed, co-expression of the *Hmgb3 Myb,* and *Cbx5* genes is sufficient to induce *HoxA/Meis1*-independent immortalization of mouse myeloid progenitors, pointing to a critical role for these genes in the leukemic process.[9] Thus, we suggest that the ectopic expression of *HMGB3*, as a result of the fusion with *NUP98*, can bypass the requirement of a concomitant *Hoxa9* and *Meis1*

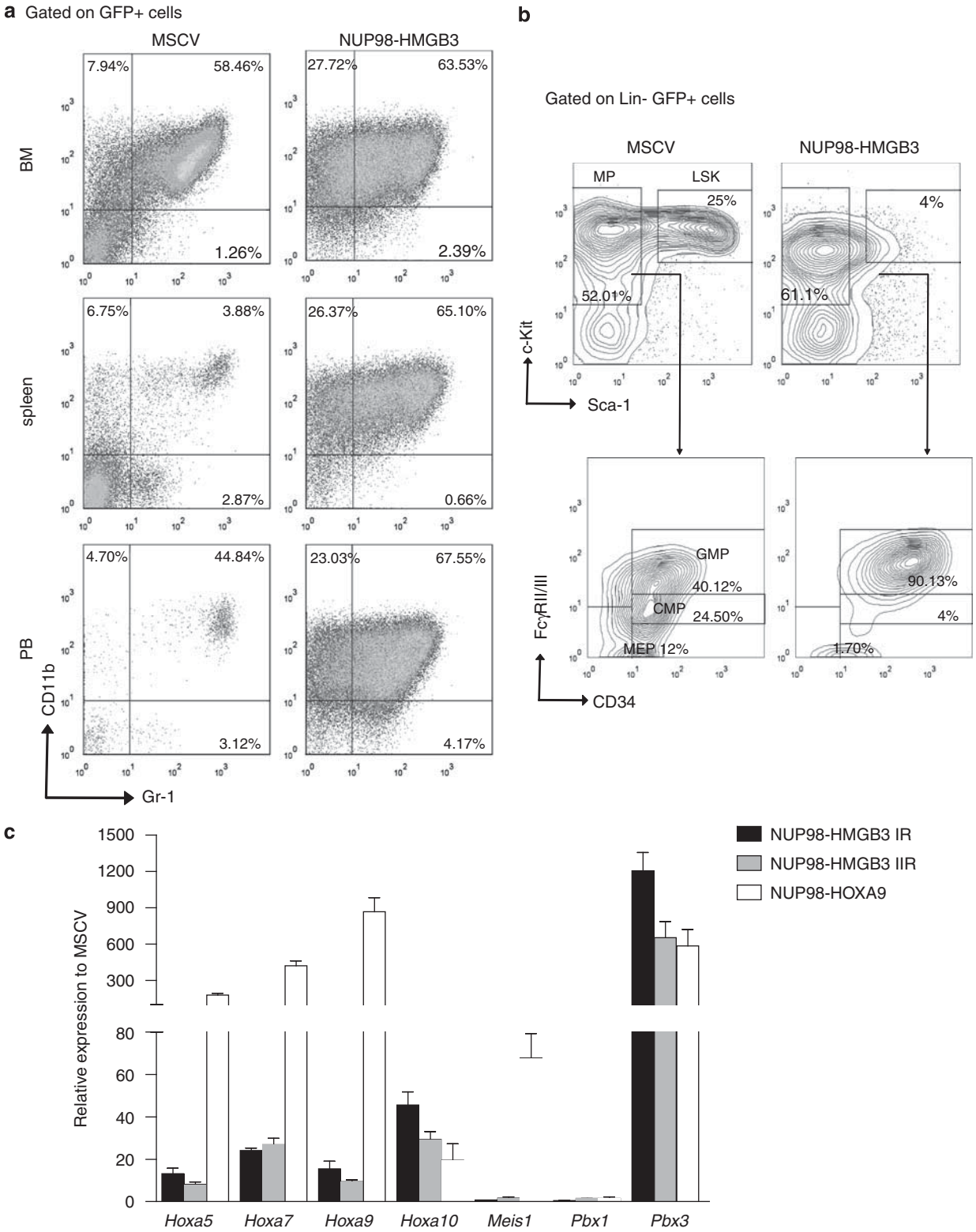


Figure 2 Cytometric analyses of the degree of hematopoietic proliferation induced by *NUP98–HMGB3*-fusion and quantification of *Hoxa* genes expression. (**a**) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of the bone marrow (BM), spleen and peripheral blood (PB) showed an enrichment for mature Gr-1$^+$CD11b$^+$ myeloid cells in primary *NUP98–HMGB3*-transduced mice, compared with mice engrafted with MSCV-transduced progenitors. (**b**) FACS analysis of the Lin$^-$Sca-1$^+$c-Kit$^+$ (LSK) and myeloid progenitor (MP) populations in the BM. MPs from primary *NUP98–HMGB3* recipients are enriched in the granulocyte-macrophage progenitor (GMP) subset whereas common myeloid progenitors (CMPs) and megakaryocyte-erythroid progenitors (MEPs) are virtually absent. (**c**) Real-time reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) analysis of endogenous *Hoxa* (*Hoxa5, Hoxa7, Hoxa9, Hoxa10*), *Meis1*, *Pbx1* and *Pbx3* genes expression in engrafted mice. Accumulation of transcript was quantified in primary (NUP98–HMGB3 IR $n=3$) and secondary (NUP98–HMGB3 IIR $n=3$) recipients, compared with NUP98–HOXA9 recipients. Levels of expression are standardized to *Abl* and expressed relative to the expression levels measured in MSCV-engrafted mice. Values shown are mean ± s.d. from two independent experiments.

misregulation in human AML. To our knowledge, this is the first report of a genetic alteration of an *HMGB* gene in human hematological malignancies. It is also the first example of a *NUP98* leukemogenic fusion whose expression is not associated with a strong *Hoxa* and concomitant *Meis1* expression. Together, the data indicate that further investigations of *HMGB3*-related leukemia may facilitate the analysis of conserved 'terminal' mechanisms of AML uncoupled from upstream events.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Julie Bergeron for help in analyses of PB and BM smears. AP acknowledges the support from the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM; Paris, France) and Association pour la recherche sur le Cancer (ARC; Villejuif, France). This work was funded by grants from ARC and Institut National du Cancer (INCa).

A Petit[1,2,5], C Ragu[1,2], V Della-Valle[1,2], MJ Mozziconacci[3], M Lafage-Pochitaloff[3], G Soler[1,2,4], C Schluth[1,2,6], I Radford[1,2,4], C Ottolenghi[1,2], OA Bernard[1,2], V Penard-Lacronique[1,2] and SP Romana[1,2,4]

[1]*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Hôpital Necker-Enfants malades, 149 rue de Sèvres, Paris, F-75015, France;*
[2]*Université Paris Descartes, 12 rue de l'Ecole de Médecine, Paris, F-75006, France;*
[3]*Laboratoire de Cytogénétique Onco-Hématologique-Hôpital Timone Enfants, 264 rue Saint-Pierre, Marseille, F-13385, France and*
[4]*Laboratoire de Cytogénétique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, Paris, F-75015, France*
E-mail: virginie.penard-lacronique@inserm.fr or serge.romana@nck.aphp.fr
[5]*Present address: AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, Service d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, 26 avenue du Docteur Arnold Netter, Paris, F-75012, France*
[6]*Present address: Service de cytogénétique, Centre de biologie et de pathologie Est, Hospices civils de Lyon, 59 boulevard Pinel, Bron, F-69677, France*

References

1 Romana SP, Radford-Weiss I, Ben Abdelali R, Schluth C, Petit A, Dastugue N *et al.* NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies: a study of the Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique. *Leukemia* 2006; **20**: 696–706.
2 Moore MA, Chung KY, Plasilova M, Schuringa JJ, Shieh JH, Zhou P *et al.* NUP98 dysregulation in myeloid leukemogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2007; **1106**: 114–142.
3 Kasper LH, Brindle PK, Schnabel CA, Pritchard CE, Cleary ML, van Deursen JM. CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 764–776.
4 Wang GG, Cai L, Pasillas MP, Kamps MP. NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 804–812.
5 Wang GG, Song J, Wang Z, Dormann HL, Casadio F, Li H *et al.* Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature* 2009; **459**: 847–851.
6 Travers AA. Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? *EMBO Rep* 2003; **4**: 131–136.
7 Nemeth MJ, Curtis DJ, Kirby MR, Garrett-Beal LJ, Seidel NE, Cline AP *et al.* Hmgb3: an HMG-box family member expressed in primitive hematopoietic cells that inhibits myeloid and B-cell differentiation. *Blood* 2003; **102**: 1298–1306.
8 Nemeth MJ, Kirby MR, Bodine DM. Hmgb3 regulates the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 13783–13788.
9 Somervaille TC, Matheny CJ, Spencer GJ, Iwasaki M, Rinn JL, Witten DM *et al.* Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; **4**: 129–140.
10 Su X, Drabkin H, Clappier E, Morgado E, Busson M, Romana SP *et al.* Transforming potential of the T-cell acute lymphoblastic leukemia-associated homeobox genes HOXA13, TLX1, and TLX3. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; **45**: 846–855.
11 Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J* 2001; **20**: 350–361.
12 Kogan SC, Ward JM, Anver MR, Berman JJ, Brayton C, Cardiff RD *et al.* Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood* 2002; **100**: 238–245.
13 Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000; **404**: 193–197.
14 Cozzio A, Passegue E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* 2003; **17**: 3029–3035.
15 Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 823–833.
16 Palmqvist L, Pineault N, Wasslavik C, Humphries RK. Candidate genes for expansion and transformation of hematopoietic stem cells by NUP98-HOX fusion genes. *PLoS ONE* 2007; **2**: e768.
17 Hirose K, Abramovich C, Argiropoulos B, Humphries RK. Leukemogenic properties of NUP98-PMX1 are linked to NUP98 and homeodomain sequence functions but not to binding properties of PMX1 to serum response factor. *Oncogene* 2008; **27**: 6056–6067.
18 Jankovic D, Gorello P, Liu T, Ehret S, La Starza R, Desjobert C *et al.* Leukemogenic mechanisms and targets of a NUP98/HHEX fusion in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; **111**: 5672–5682.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Leukemia, Mar;24(3):654-8, copyright 2010

D. Etude de la fusion *NUP98-CCDC28A*

1. INTRODUCTION

Dans le cadre du travail collaboratif du GFCH, une translocation t(6 ;11) impliquant NUP98 avait été identifié dans une hémopathie maligne humaine.

Mon travail de recherche a d'abord consisté à caractériser cette translocation sur plan moléculaire afin d'identifier le gène partenaire *CCDC28A*. Dans un deuxième temps, afin d'étudier fonctionnellement ce gène *CCDC28A* de fonction inconnue, ainsi que le gène chimérique *NUP98-CCDC28A* induit par la fusion, des vecteurs rétroviraux ont été construits. Ces vecteurs ont permis d'étudier *in vitro* et *in vivo* le pouvoir transformant de cette nouvelle fusion.

2. MATERIEL ET METHODES

a) Cas clinique

Un homme de 26 ans a présenté une leucémie aiguë lymphoblastique T, de novo, hyperleucocytaire, de type II CD10+. Le caryotype médullaire a mis en évidence une anomalie clonale 46,XY,t(6;11)(q21q22;p15),add(12)(p13). Le remaniement de *NUP98* dans cette translocation a été confirmé par hybridation in situ fluorescente (FISH), en utilisant comme sonde deux BACs 120E20 et 258P13 couvrant le locus de ce gène (Romana et al., 2006). Cette même translocation a été rapportée dans un cas de leucémie aigue mégacaryoctytaire (LAM M7) (Tosi et al., 2005).

b) Caractérisation moléculaire de la fusion

(1) Cytogénétique moléculaire : Hybridation in situ en fluorescence (FISH)

Préparation de sondes FISH par marquage direct

Les sondes sont préparées à partir de BACs (Bacterial Artificial Chromosome) du chromosome 6 (6q23-q24) (RP11-138K10, RP11-900M13, RP11-721P14) et de deux BACs RP11-120E20 et RP11-258P13 situés en 11p15.4. Le BAC RP11-120E20 contient dans sa partie centromérique une grande partie du gène *NUP98*, alors que le BAC RP11-258P13 est

situé à environ 40 kb de l'extrémité centromérique du BAC RP11-120E20 et ne couvre pas le locus *NUP98*. L'ADN du BAC est extrait, selon le protocole QIAfilter Plasmid Maxi-kit (QIAGEN). 1 µg de chaque BAC est ensuite marqué par nick-translation, selon le protocole recommandé par le founisseur (Vysis), en utilisant comme fluorochrome de la fluorescéine 12dUTP ou de la tétraméthyl rhodamine 6dUTP. Quatre cents ng de sonde marquée sont précipités en présence de 20 µg d'ADN Cot1, puis repris dans 6µL de tampon d'hybridation (50% formamide, 2XSSC, 0,1% SDS, 40 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4).

Hybridation

Six microlitres de sonde sont déposés sur la zone de la lame à hybrider, recouverte d'une lamelle scellée par rubber-cement. L'ADN de la sonde et des chromosomes ou noyaux sont co-dénaturés sur plaque chauffante à 72°C pendant 3 minutes, puis hybridés 16 heures en chambre noire et humide à 37°C. Les lames sont ensuite lavées en 1XSSC pH7 à 70°C pendant 5 min, puis montées avec une solution de DAPI (1 µg/mL dans Vectashield) et recouvertes d'une lamelle. Les images sont obtenues avec un microscope à fluorescence Leica, équipé d'une caméra CCD et des filtres appropriés, puis traitées par le logiciel QFISH (Leica). La localisation chromosomique de chaque sonde est d'abord vérifiée par hybridation sur chromosomes de témoins.

(2) Extraction des acides nucléiques

Un culot de 10 millions de cellules est traité par la protéinase K (100 µg/mL) dans du TE pH 7,4, 1% SDS et 0,5 M NaCl, à 37°C pendant 17 heures. L'ADN est ensuite extrait classiquement par une solution de phénol-chloroforme, précipité à l'éthanol et repris dans du TE pH 8. L'ARN total est extrait en utilisant le kit RNeasy (QIAGEN), selon les instructions du fabriquant.

(3) Southern blot

Southern blot

10 µg d'ADN génomique du patient, et d'un donneur sain (témoin), sont digérés par l'une des enzymes de restriction suivantes : BamH1, HindIII et BglII (2U/µg d'ADN), dans le tampon approprié à 37°.

L'ADN digéré est migré sur gel d'agarose 1%-TAE1X-BET. Le gel est ensuite traité successivement par HCl 0,125 M pendant 10 min, NaOH 0,5 M/NaCl 1,5M pendant 30 min et NaCl 1,5 M/Tris 0,5 M pH7,5 pendant 30 min. Le transfert sur membrane Hybond N+

(Amersham) est réalisé dans du tampon 20XSSC. L'ADN est fixé à la membrane à 80°C pendant 2 heures.

La membrane est préhybridée dans un tampon (6XSSC, PVP 2g/L, Ficol 2g/L, BSA 2g/L, SDS 0,2%) avec 200 µg/mL d'ADN de sperme de saumon, puis hybridée dans le tampon (PVP 2g/L, Ficoll 2g/L, sulfate de dextran 100g/L, BSA 2g/L, SDS 0,2%, 6XSSC), en présence de la sonde radiomarquée, préalablement dénaturée à 65°C pendant 17 heures.

Après hybridation, les membranes sont lavées successivement : 15 min dans 2XSSC/0,2%SDS à température ambiante, 15 min dans 2XSSC/0,2%SDS à 65°C, 30 min dans 0,2XSSC/0,2%SDS à 65°C et 30 min dans 0,1XSSC/0,2%SDS.

La membrane est révélée par autoradiographie.

Sondes

Les sondes utilisées (***Tableau 3***) pour l'analyse de Southern blot sont des produits de PCR spécifiques de différents fragments de restriction des gènes *NUP98* (Sondes A à L) et *CCDC28A* (Sonde CCDC28A). Les sondes sont radiomarquées au P^{32} par random priming : 25 ng d'ADN sonde, dénaturés préalablement, sont incubés avec une solution de "multiprime" 5X (DTT 10 mM, $MgCl_2$ 25 mM, Hepes 0,5 mM, dATP 0,5 mM, dGTP 0,5 mM, dTTP 0,5 mM, hexanucléotide 6 U DO/mL), le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I (0,15 U/µL) et de l' α-dCTP- P^{32} (0,75 nmol/µL) à 37°C pendant 45 min. L'excès de α-dCTP- P^{32} est éliminé par filtration sur colonne G50 (Amersham).

c) PCR

PCR inverse (Figure 7)

1 µg d'ADN génomique du patient est digéré par l'enzyme de restriction HindIII à 37°C pendant 5 heures. Les fragments de restriction sont circularisés par l'enzyme T4-ADN ligase (Roche) à 4°C pendant 17 heures.

Une PCR avec les amorces 5E et 3E (1 pmol/µl) est réalisée avec 5 µl de produit de digestion-ligation, dNTP (0,5 mM /µl), $MgSO_4$ (2 mM/µl), Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) (0,05U/µl), dans le tampon approprié et les cycles suivants : 4 cycles (94°C 30 sec, 52°C 30 sec, 68°C 1 min), 4 cycles (94°C 30 sec, 50°C 30 sec, 68°C 1

AMORCES POUR SONDES DE SOUTHERN				
	Amorce	Séquence	Gène	Position
Sonde A	10-For	AGTCTAACATACTCACCTTTTGG	NUP98	Exon 13 : 60-82
	10-Rev	CTGCCTTATTTCAGGACTGTTG	NUP98	Intron 13 : 227-248
Sonde B	9-For	CCTTGTTTTATGGGAACAGAGAC	NUP98	Intron 13 : 3467-3489
	9-Rev	CAAAGTGGACTGTATCACATCT	NUP98	Intron 14 : 89-110
Sonde C	1-For	ATCTGCTGAAGCAGGCCCTTG	NUP98	Intron 11 : 5410-5430
	1-Rev	ATGGTCCACAATTTGAGAGACA	NUP98	Intron 11 : 6221-6242
Sonde D	2-For	ATTCTTCCCCGTTTTACACTTCTA	NUP98	Intron 11 : 7789-7812
	2-Rev	GTATTTGACAACCAGGGCTCTTA	NUP98	Intron 11 : 8197-8219
Sonde E	3-For	GGTAACCCACTGACTTTCTTCT	NUP98	Intron 12 : 6026-6047
	3-Rev	CTAGACAGGACAAGTTTGCTC	NUP98	Intron 12 : 6731-6751
Sonde F	4-For	CTAGTGAAAAGATCATAGATGC	NUP98	Intron 13 : 2169-2190
	4-Rev	ATCTTGTCCATTCTCTTCATC	NUP98	Intron 13 : 2850-2890
Sonde G	11-For	GGCAAACCAAAGAAAGTAA	NUP98	Intron 14 : 5686-5704
	11-Rev	AGAAACCAAAAGAAGAAGAAA	NUP98	Intron 14 : 6142-6162
Sonde H	7-For	TCCTAAGCAAACCTGTTGAT	NUP98	Exon 16 : 9-28
	7-Rev	TTACAAAGCCAGGGAAAAT	NUP98	Intron 16 : 279-297
Sonde I	12-For	TGGGTGTCCTTTGAAAATAATGTT	NUP98	Intron 16 : 2003-2026
	12-Rev	GGCCCAAATGTAGGAAAATGAA	NUP98	Intron 17 : 86-107
Sonde J	5-For	CAGATCAGATATGGGAAGTT	NUP98	Intron 10 : 1282-1301
	5-Rev	AGAGACAGACACCAAGTATC	NUP98	Intron 10 : 1706-1725
Sonde K	13-For	AGAAGGAAGCTGTGGACT	NUP98	Intron 7 : 2743-2760
	13-Rev	TCATTAAATACCCTCAACTCTT	NUP98	Intron 8 : 106-127
Sonde L	14-For	GCAGGATTTGGAACAGGTAA	NUP98	Exon 11 : 78-Intron 11 :4
	14-Rev	GGCAGGTAGAAGGGTCAGTA	NUP98	Intron 11 : 506-525
AMORCES POUR PCR et RT-PCR				
PCR inv	5’	AGGTGAGTATGTTAGACTATTG	NUP98	Exon 13 : 56-77
	3’	AATCCGATGTCAGACCCTAA	NUP98	Exon 13 : 102-121
Der11	F	AATCCGATGTCAGACCCTAA	NUP98	Exon 13 : 102-121
	R	AATGCCCAGTCTCTAATCCC	CCDC28A	Intron 1 : 643-662
NNP6t	F	GCCCCTGGATTTAATACTACGA	NUP98	1492-1513
	R	AGCGCCTTTGCCCTCTCC	CCDC28A	633-650
NP6NUPt	F	TGCGGCGGTGGCTTCTGA	CCDC28A	329-346
	R	AACCATAACCTTTCCGACCAAT	NUP98	2392-2413
NP6t	F	GGCCCCAATACCCTTCTTCTT	CCDC28A	378-398
	R	AGCGCCTTTGCCCTCTCC	CCDC28A	633-650
CCDC28A ORF	F	TACAGCTAAAGGAAGGACAGG	CCDC28A	141-161
	R	TCAAATCACAAGAAAGCAAACT	CCDC28A	1009-1030
CCDC28A Tag HA 3’	F	GCGGATCCATGCCGAGGGCGGAGCCA	CCDC28A	174-191
	R	GGCAAGCTTTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACACGCTAGCAGAAGTATTTGG	CCDC28A	978-996
CCDC28A Tag HA 5’	F	GCGGATCCATGGTGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGCCGAGGGCGGAGCCA	CCDC28A	174-191
	R	GGCAAGCTTTTAGCTAGCAGAAGTATTTG	CCDC28A	979-988

Tableau 3: Séquences des amorces utilisées

Pour les études génomiques, la position 1 des amorces correspond à la première base de l’intron ou de l’exon. Pour les études des transcrits, la position 1 correspond à la première base de la séquence U41815 pour NUP98, AY167571 pour CCDC28A. Pour les constructions, la séquence nucléotidique codant pour le peptide HA est colorée en bleue, et les sites de restriction ajoutés en rose.

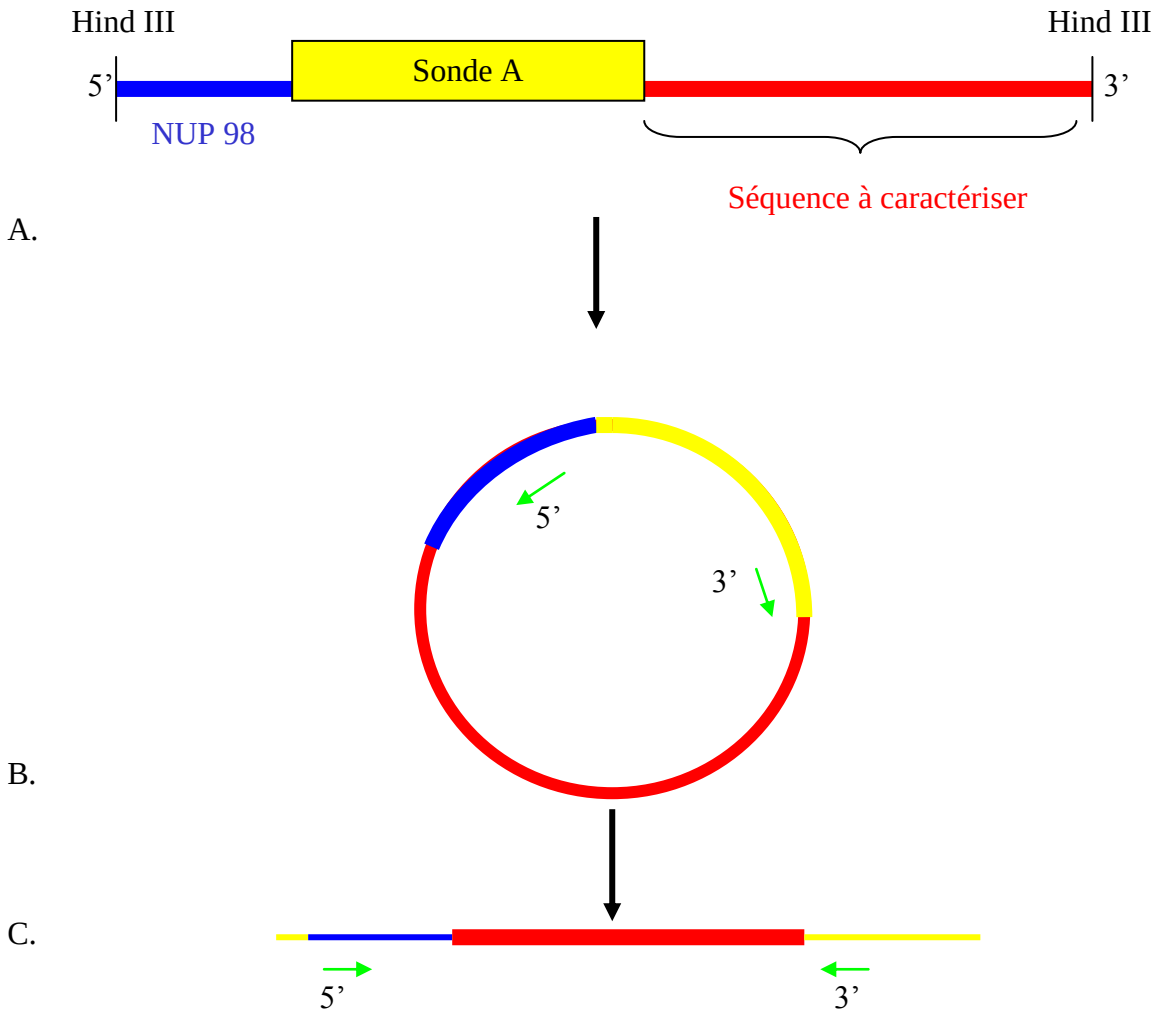


Figure 7. Principes de la PCR inverse

A- Fragment de restriction Hind III remanié contenant la fusion de NUP98 avec son partenaire sur le chromosome 6 dont la séquence n'est pas connue.
B- Etape de ligation, et position des amorces PCR inv 3' et 5' orientées en sens inverse.
C- Etape de PCR

min), 4 cycles (94°C 30 sec, 48°C 30 sec, 68°C 1 min), 25 cycles (94°C 30 sec, 46°C 30 sec, 68°C 1 min + 10 sec/cycle), 1 cycle 68°C 7 min.

Le produit final est purifié par le kit High Pure PCR Product Purification (Roche) et séquencé.

Reverse transcription

2 µg d'ARN total sont incubés dans 20 µl final, en présence de random primers (50 ng), de l'enzyme Supersript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) (200U), de dNTP 10 mM (1µl), DTT 0,1 M (2µl), du tampon approprié 5X (4µl) à 42° pendant 50 min. La réaction est arrêtée à 70°C pendant 15 minutes.

RT-PCR quantitative

Les ADN complémentaires sont amplifiés avec l'enzyme TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied BioSystem, Courtaboeuf, France) et 10 pmoles d'amorces et de sondes. Les échantillons sont analysés par RT-PCR en utilisant le kit Taq gene expression assays (Applied Biosystems) avec les sondes suivantes: *HoxA3* (Mm01326402_m1), *HoxA5* (Mm00439362_m1), *HoxA7* (Mm00657963_m1), *HoxA9* (Mm00439364_m1) and *HoxA10* (Mm00433966_m1). L'expression relative des gènes est normalisée sur l'expression du gène *Abl* (Mm00802038_g1). Les PCR en temps réel sont réalisées et analysées en triple sur l'appareil, ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied BioSystem).

d) Construction des vecteurs

Clonage du gène CCDC28A

Le transcrit CCDC28A est amplifié à partir d'ADNc cellulaire d'une lignée de cellules REH, par RT-PCR oligo-spécifique avec l'amorce CCDC28A ORF-F, en présence d'oligonucléotides et de Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). L'ADNc obtenu est amplifié en présence des amorces CCDC28A ORF-F et CCDC28A ORF-R et de la DNA Taq Polymerase (Invitrogen). Le produit de PCR obtenu (890 pb) est purifié sur gel, puis sous-cloné. Le produit de PCR obtenu, CCDC28A-ORF, est phosphorylé par la T4 polynucléotide kinase (Invitrogen), puis incubé avec un plasmide KS blueScript déphosphorylé et digéré par EcoRV en présence de T4 DNA ligase (Roche). Après précipitation, le produit de ligation est électroporé (Gene Pulser de Biorad) dans 40 µl de bactéries E.Coli XL1-Blue compétentes. Les bactéries transformées sont ensemencées sur milieu LAIX (LB Agar, Ampicilline, IPTG, Xgal), et mise à l'étuve à 37° pendant 16 heures. Les bactéries transformées, ayant intégré le plasmide KS-CCDC28A ORF, résistantes à l'ampicilline, sont

sélectionnées. Les clones sélectionnés sont remis en culture dans 3 ml de LB/Ampicilline pendant 12h. L'ADN plasmidique est extrait et analysé par digestion avec les enzymes HindIII et EcoRV. Les plasmides, ayant intégré l'insert CCDC28A-ORF, sont vérifiés par analyse de leur séquence nucléotidique.

Clonage CCDC28A Tag HA

Pour le clonage de CCDC28A dans un vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (Invitrogen), un peptide hémagglutinine (HA) est ajouté à l'extrémité amino ou carboxy-terminale par PCR. Les oligo-nucléotides choisis incluent un site de restriction BamH1 en 5' et un site Hind III en 3' pour orienter l'insert dans le vecteur. L'insert CCDC28A Tag HA est ensuite transféré dans un vecteur murin rétroviral Murine Stem Cell Virus (MSCV) qui co-exprime une protéine fluorescente (eGFP), grâce à une séquence IRES (internal ribosome entry site). Le vecteur est vérifié par séquençage.

Clonage fusion NUP98-CCDC28A Tag HA

Un fragment de la fusion NUP98-CCD28A (comprenant une partie 3' de NUP98 et l'ensemble de CCDC28A) est obtenu par PCR à partir de l'ADNc du patient. Ce fragment comprend un site naturel de restriction HindIII en position 5', situé dans NUP98, auquel est ajouté par PCR un site BamH1 en position 3', après la partie CCDC28A. Un vecteur MSCV-IRES-eGFP-NUP98-HOXA9, disponible au laboratoire, est utilisé après digestion HindIII/BamH1 (permettant de libérer le fragment NUP98 à partir du site Hind III et l'ensemble d'HOXA9, le site BamH1 étant situé en 3' dans le MSCV) et ligation du produit de PCR NUP98-CCDC28A précédemment décrit. Le vecteur est vérifié par séquençage.

e) Analyse de la protéine CCDC28A par transfection transitoire

Transfection transitoire sur cellules NIH3T3

Les cellules NIH3T3 sont des fibroblastes murins. 20 000 cellules par puit sont mises en culture en atmosphère humidifiée à 37°C avec 5% de CO_2, pendant 48 heures, dans 400 µl de milieu complet (1/2 DMEM, ½ HAM F-12, pyruvate de Na, pénicilline, streptomycine, glucose 30%, glutamine). Puis, les cellules sont mises au contact d'un milieu contenant 150 µl d'OPTIMEM, 0,66 µl de Lipofectine Reagent (Invitrogen) (1mg/ml), 300 ng d'ADN plasmidique (pcDNA3 vide, pcDNA3/NP6 TagHA 3', pcDNA3/NP6 TagHA 5'), ou du contrôle pcDNA3/LMO2, pendant 6 heures à l'étuve à 37°C. Le milieu est ré-aspiré, et les cellules sont remises en culture dans 300 µl de milieu complet pendant 48h sur des lamelles.

Immunofluorescence

Les lamelles sont rincées par du PB1X, fixées par du paraformaldéhyde 3% pH 7,4 pendant 10 minutes à température ambiante, plongées dans un bain de glycine 20 mM pendant 10 minutes à température ambiante, puis dans trois bains successifs de PBS 1X . Les cellules sont perméabilisées dans un bain de Triton X-100 0,2% + BSA 0,1 % pendant 8 minutes, puis rincées par trois bains successifs de PBS1X + BSA 0,1%. Elles sont incubées en présence de l'anticorps primaire de souris anti-HA 12CA5 (Roche) dans du TBS1X-Tween0,1%-lait 5%(TBS-Tween-lait), pendant deux heures à température ambiante, puis lavées trois fois dans du TBS-Tween-lait. L'anticorps secondaire marqué au FITC (anti-souris) est dilué au 1/200ème dans du TBS-Tween-lait. Les cellules sont incubées avec 100 µl de cette solution pendant 45 min, puis lavées par deux bains de TBS-Tween-lait, 2 bains de TBS1X-Tween 0,1%. Les noyaux sont révélés par 20 µl de DAPI (1 µg/mL dans Vectashield), et les lames sont recouvertes d'une lamelle.

f) Transplantation de moelle osseuse et analyse des animaux

Le laboratoire INSERM dispose des habilitations nécessaires aux études sur les souris. Les surnageants viraux ont été obtenus selon la technique déjà décrite (Malinge et al., 2007). Brièvement, des souris C57Bl/6 de 6 à 8 semaines reçoivent une injection de 5FU (5-fluoruracile), 5 jours avant le recueil de la moelle osseuse (afin de mobiliser les progéniteurs hématopoïétiques) à partir des tibias et fémurs. Les cellules médullaires recueillies sont purgées des cellules exprimant des marqueurs de surface spécifiques de lignée (Kit BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) et sont mises en culture deux jours dans du RPMI1640 supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin, en présence de cytokines murines recombinantes IL-3 (10 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL), FLT3-L (100 ng/ml), SCF (100 ng/ml), thrombopoietin (2 U/ml) et IL-11 humaine recombinante (10 ng/ml) (PromoCell, Heidelberg, Germany). Les cellules sont mélangées avec le surnageant viral au 3ème et 4ème jour, et infectées par spinoculation pendant 90 minutes à 1800*g*. Après la deuxième infection, 10 000 cellules sont injectées dans la veine rétro-orbitaire de souris C57Bl/6 irradiées léthalement**.** La qualité de la transduction des cellules injectées est vérifiée en cytométrie de flux par analyse de l'expression de la GFP, comprise entre 40 et 50%. Les prélèvements sanguins sont réalisés toutes les semaines à l'œil et recueillis dans des tubes EDTA ou héparinés, et analysés sur l'appareil MS9-5V (Melet Schloesing, Cergy-Pontoise, France). Les souris malades sont sacrifiées, un recueil des différents tissus (sang total, moelle osseuse, os, foie, rate, rein, thymus) est pratiqué pour les analyses cytologiques et histologiques, et pour congélation. Les frottis sanguins et cytospins sont analysés par microscopie optique, après coloration classique MGG (May Grünewald Giemsa). L'analyse

histologique est réalisée après fixation au formol, par la société Biodoxis (Romainville, France). 10^6 cellules de moelle osseuse de souris malades sont réinjectées chez des receveurs secondaires léthalement irradiées dans les mêmes conditions que précédemment décrites.

g) Tests clonogéniques

10^4 cellules de moelle osseuse, issue de la même préparation, que les cellules infectées réinjectées aux souris, sont mises en culture dans des boîtes de pétri de 35 mm contenant de la méthyl-cellulose M3434 (StemCell Technologies Inc.). Les colonies sont comptées au 7ème jour. Toutes les semaines, 10^4 des cellules résiduelles sont remises en culture.

h) Marquages cellulaires et analyse de cytométrie en flux

Le marquage des cellules pour la cytométrie en flux est réalisé dans du tampon BDImag (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Les anticorps sont obtenus de BD Pharmingen (APC-conjugated c-Kit, Gr1, B220 and CD8; PE-conjugated Mac1/CD11b, Ter119, CD42, CD19 and CD4; PE-Cy7-conjugated Sca1; biotin-conjugated CD71 and CD71; APC-Alexa fluor 750-conjugated streptavidin), à l'exception du GPIba/CD42b PE-marqué (Emfret Analytics Gmbh, Würzburg, Germany) et du CD34 FITC-marqué (eBiosciences, San Diego, CA, USA). L'acquisition des données est réalisée sur le cytomètre de flux CyAn™ ADP flow cytometer (DAKO, Glostrup, Denmark) ; leur analyse est réalisée sur le programme Summit.4 software.

i) Northern blot

La sonde CCDC28A de northern blot pour le transcrit du gène *CCDC28A* est obtenue, par PCR avec les amorces CCDC28A ORF-F et CCDC28A ORF-R, à partir du plasmide KS/ CCDC28A ORF et radiomarquée par random priming. La membrane Human 12-Lane-MTN Blot (Clontech) a été hybridée selon le protocole du producteur, puis révélée par autoradiographie.

j) Analyse de séquences

Les séquences ont été analysées par le logiciel DNAStar et par les sites de l'UCSC (http://genome.ucsc.edu/), NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), Ensembl (http://www.ensembl.org/) et PSORT (http://psort.nibb.ac.jp).

3. RESULTATS

a) Le gène *NUP98* est fusionné au gène *CCDC28A* par la t(6;11)(q24.1;p15.4)

Localisation du point de cassure par Southern Blot

L'analyse par Southern blot de l'ADN génomique du patient (***Figure 8***), en utilisant différentes sondes du gène *NUP98*, a identifié des fragments de restriction de taille anormale, témoins d'un remaniement du gène *NUP98*. L'hybridation de la sonde A (intron 13 de *NUP98*) a mis en évidence la présence d'un fragment remanié HindIII de 700 pb et un fragment remanié BamH1 de 6 kb, en plus des fragments normaux. Ces résultats ont permis de positionner le point de cassure dans l'intron 13 du gène *NUP98*. L'hybridation de la sonde B (intron 14 de *NUP98*), qui permet théoriquement d'explorer le der(6)t(6;11), n'a pas mis en évidence de remaniement, ce qui suggère une délétion de cette région, à la suite de la translocation.

Caractérisation du gène partenaire par PCR inverse

Le fragment HindIII remanié de 700 pb, mis en évidence par la sonde A, correspond au dérivé 11 et contient à la fois des séquences du chromosome 11 et du chromosome 6. La PCR inverse a amplifié un fragment spécifique, qui comprend une séquence ne provenant pas du chromosome 11. L'analyse de la séquence du fragment amplifié permet de localiser le point de cassure de la translocation, dans l'intron 13 de *NUP98* et dans l'intron 1 d'une unité transcriptionnelle, située normalement sur le chromosome 6 (non montré). Ce gène *CCDC28A*/*C6orf80*/*CCRL1AP*/*MGC131913* (Genbank accession number NM_015439) est constitué de 6 exons, s'étend sur 19,81 kb en 6q24.1 et code pour un transcrit théorique de 1505 pb.

Confirmation de la fusion NUP98-CCDC28A sur l'ADN du patient

Une PCR, réalisée à l'aide des amorces der11-F et der11-R, a permis d'amplifier un fragment de jonction de 503 pb à partir de l'ADN génomique du patient. La séquence a confirmé la fusion entre l'intron 13 de *NUP98* et l'intron 1 de *CCDC28A* (***Figure 9A***).

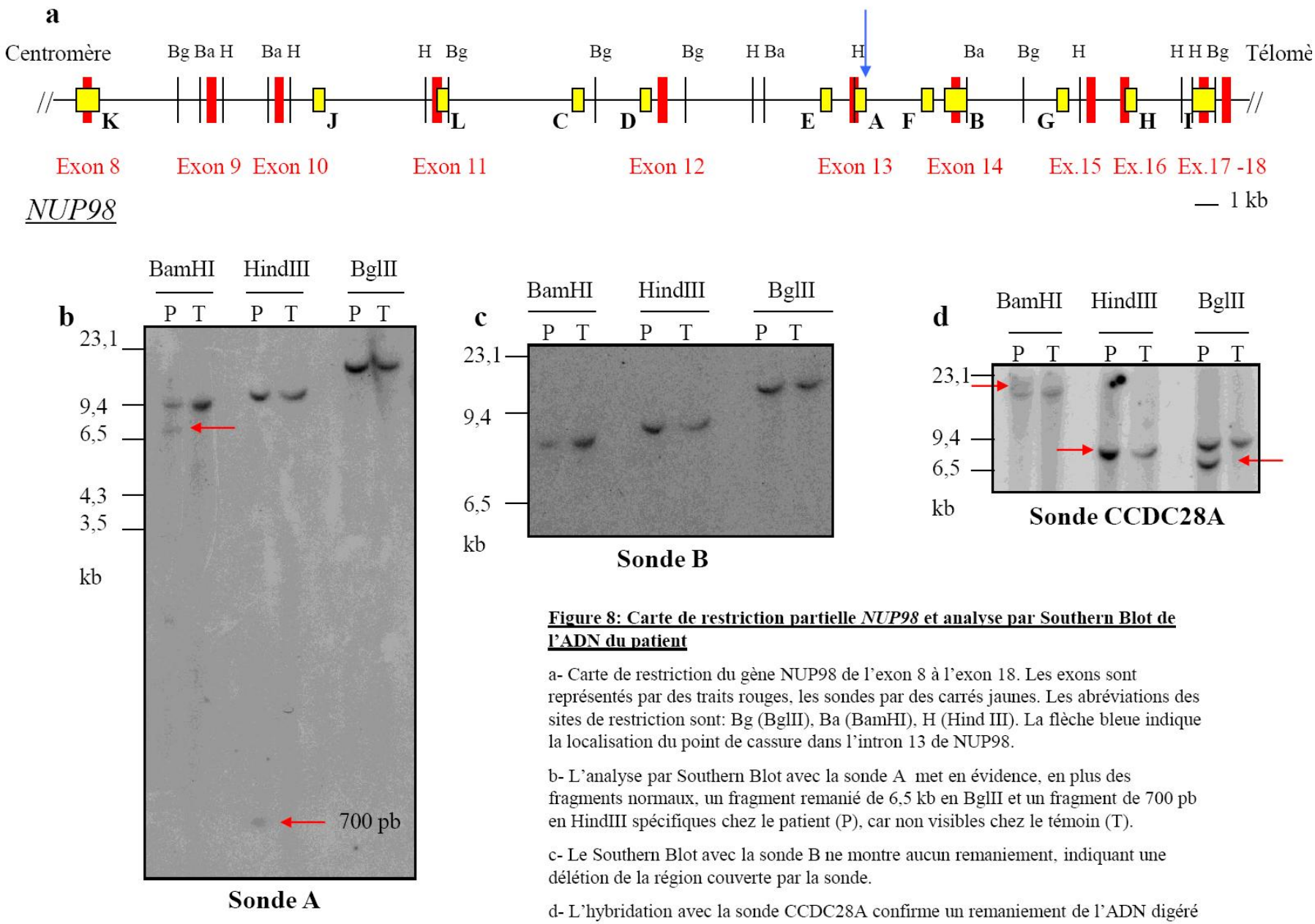


Figure 8: Carte de restriction partielle *NUP98* et analyse par Southern Blot de l'ADN du patient

a- Carte de restriction du gène NUP98 de l'exon 8 à l'exon 18. Les exons sont représentés par des traits rouges, les sondes par des carrés jaunes. Les abréviations des sites de restriction sont: Bg (BglII), Ba (BamHI), H (Hind III). La flèche bleue indique la localisation du point de cassure dans l'intron 13 de NUP98.

b- L'analyse par Southern Blot avec la sonde A met en évidence, en plus des fragments normaux, un fragment remanié de 6,5 kb en BglII et un fragment de 700 pb en HindIII spécifiques chez le patient (P), car non visibles chez le témoin (T).

c- Le Southern Blot avec la sonde B ne montre aucun remaniement, indiquant une délétion de la région couverte par la sonde.

d- L'hybridation avec la sonde CCDC28A confirme un remaniement de l'ADN digéré avec les 3 enzymes BglII, HindIII et BamH1.

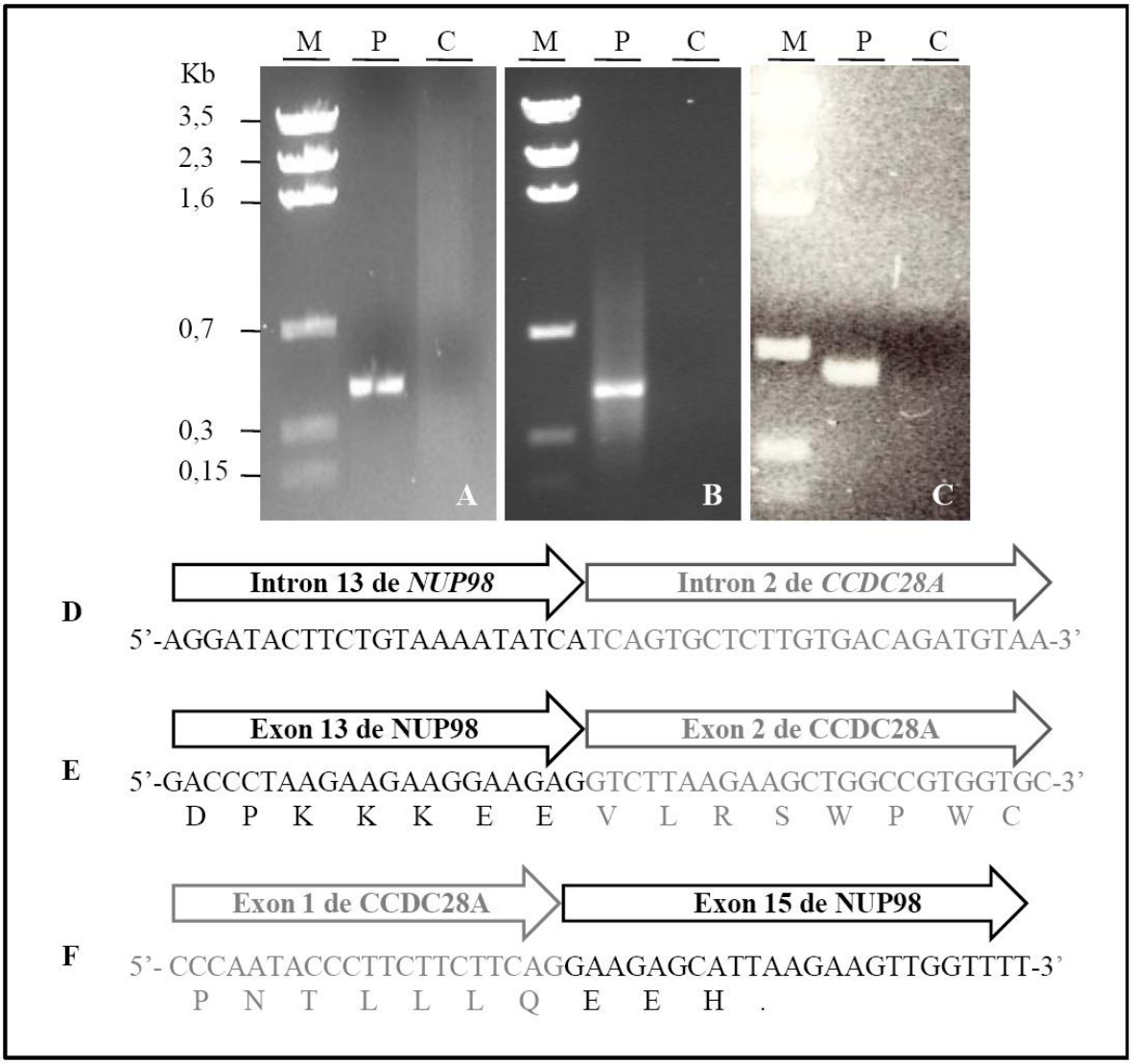


Figure 9. PCR et analyse des séquences *NUP98-CCDC28A* et *CCDC28A-NUP98*

A. Un produit spécifique de 503 paires de base (pb) est amplifié à partir du patient (P), contrairement au contrôle (T). M, marqueur de poids moléculaire. **B.** L'analyse de la RT-PCR, amplifiant la fusion *NUP98-CCDC28A*, montre un produit spécifique de 444 pb. **C.** Un transcrit réciproque spécifique de 612 bp est amplifié par RT-PCR. **D.** L'analyse partielle de la séquence nucléotidique de la fusion génomique *NUP98-CCDC28A* montre une fusion joignant le nucleotide (Nt) 62503 de *NUP98* (Genebank accession number NC_0000011) et le Nt 653 de *CCDC28A* (NC_000006). **E.** L'analyse partielle de la séquence nucléotidique du transcrit NUP98-CCDC28A montre une fusion conservant le cadre de lecture joignant le Nt 1833 de NUP98 (NM_139131) et le Nt 384 de CCDC28A (NM_015439). **F.** L'analyse partielle de la séquence nucléotidique du transcrit réciproque CCDC28A-NUP98 montre une fusion avec un codon stop précoce, joignant le Nt 383 de CCDC28A et le Nt 2022 de NUP98.

Mise en évidence des transcrits de fusion NUP98-CCDC28A et CCDC28A-NUP98

Par RT-PCR, à l'aide des amorces NNP6-F et NNP6-R, un fragment de la taille attendue de 444 pb, a été amplifié à partir du matériel du malade, dont la séquence confirme la fusion en phase de l'exon 13 de *NUP98* avec l'exon 2 de *CCDC28A*. Une deuxième RT-PCR, réalisée à l'aide des amorces NP6NUP-F et NP6NUP-R, a permis d'amplifier un fragment de 622 pb, correspondant à un transcrit de fusion réciproque, entre l'exon 1 de *CCDC28A* et l'exon 15 de *NUP98*, mais cette fusion ne conserve pas la phase ouverte de lecture de *NUP98* (***Figures 9B et 9C***).

Confirmation de la fusion NUP98-CCDC28A par FISH

La FISH en double couleur, réalisée avec comme sondes, le BAC 900M13 couvrant *CCDC28A* et les BACs recouvrant le locus du gène *NUP98*, a montré l'existence de deux signaux de co-localisation, sur les deux dérivés chromosomiques. Ces résultats permettent de localiser le point de cassure sur le der(6) en 6q24.1 et confirment l'existence d'une translocation apparemment équilibrée t(6;11)(q24.1;p15.5), remaniant les gènes *NUP98* et *CCDC28A* (***Figure 10***).

b) Expression de CCDC28A par Northern Blot

L'analyse du Northern blot avec la sonde CCDC28A, montre la présence d'un transcrit unique de 1,5 kb. L'expression du transcrit est ubiquitaire, mais plus fortement marquée dans le rein et dans le placenta. CCDC28A est exprimé dans la rate, le thymus et dans les lymphocytes périphériques (***Figure 11***).

c) Protéine CCDC28A

***Étude in silico de la protéine* CCDC28A**

Le gène *CCDC28A* code pour une protéine putative de 274 acides aminés (AA), qui n'est pas apparentée à une famille connue**.** La protéine humaine CCDC28A possède dans sa partie carboxy-terminale un domaine de 30 aa, de type coiled-coil (CC), qui est une caractéristique de plusieurs protéines partenaires de NUP98 (voir revue (Romana et al., 2006)).

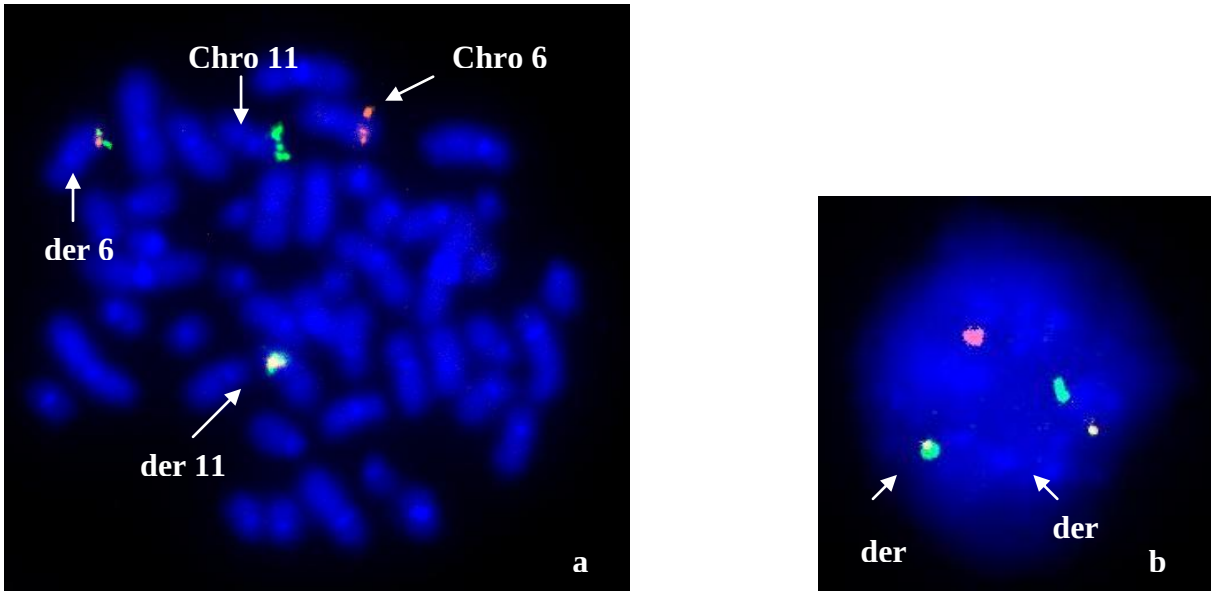


Figure 10: FISH confirmant la fusion *NUP98-CCDC28A*

L'hybridation est effectuée sur chromosomes métaphasiques (a) et noyaux interphasiques (b). La sonde marquée en fluorescéine (couleur verte) est constituée des BACs 120E20 et 258P13 (11p15.4) et explore le locus du gène *NUP98*. La sonde marquée en rhodamine (couleur rouge) est constituée du BAC 900M13 (6q24.1) explorant le locus du gène *CCDC28A*. La coalescence des signaux rouges et verts correspond à la fusion des deux gènes sur les deux dérivés chromosomiques.

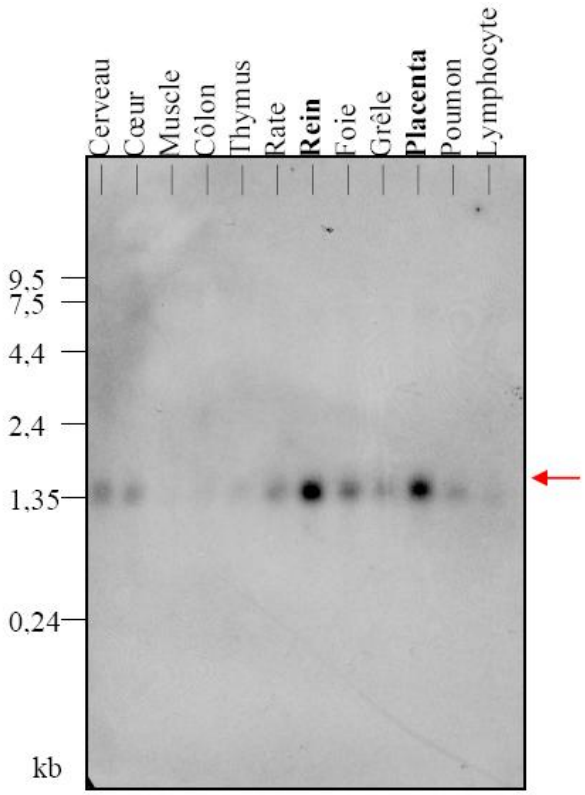


Figure 11. Northern Blot : profil d'expression CCDC28A dans les tissus humains adultes

L'étude des bases de données a identifié le gène *MGC1203/CCDC28B* (coiled-coil domain-containing protein 28B), localisé en 1p35.1, comme seul gène homologue à *CCDC28A* dans le génome humain. Bien que les fonctions de la protéine soient inconnues, des mutations de *MGC1203* ont été identifiées dans 6% des patients présentant un syndrome de Bardet-Biedl (BBS), qui est une maladie génétique associée à une anomalie des corps ciliaires. La présence de cette mutation amplifie le phénotype clinique de cette maladie (Badano et al., 2006). La protéine CCDC28B prédite, de 241 AA (Q8TBV8), ne possède pas de motifs reconnaissables et sa fonction est inconnue, mais elle colocalise avec des protéines BBS, dans des structures péricentriolaires (Badano et al., 2006).

D'autres protéines apparentées sont prédites chez d'autres espèces, dont la protéine codée par le gène *CG10874* chez la drosophile. Deux domaines sont particulièrement conservés, (80% d'homologie entre l'homme et la drosophile) : un premier domaine de 37 acides aminés (aa 161 à 198), qui ne représente aucun motif décrit à ce jour, et un deuxième domaine de 15 acides aminés (AA 243 à 258), qui contient une partie du domaine coiled-coil (***Figure 12***).

Localisation sub-cellulaire de la protéine* CCDC28A *par immunofluorescence

L'étude en immunofluorescence indirecte, de la location subcellulaire de la protéine CCDC28A associée à un épitope HA, montre que la protéine est localisée dans le cytoplasme (***Figure 13).***

d) Etude de la fusion *NUP98 -CCDC28A*

L'expression de la fusion NUP98-CCDC28A dans la moelle osseuse de souris transplantées entraine une leucémie rapide et mortelle.

Tous les animaux, qui ont été transplantés avec des cellules transduites par la fusion *NUP98-CCDC28A* (n=20), ont succombé 32 semaines après la transplantation, à des syndromes myéloprolifératifs (MDP-like leukemia, selon la classification de Bethesda), avec une médiane de 93 jours post-transplantation. Le potentiel leucémique de l'expression de CCDC28A a été évalué, mais aucune souris n'a développé de leucémie (***Figure 14***). Les analyses de Southern blot sur l'ADN génomique des cellules murines ont montré la présence

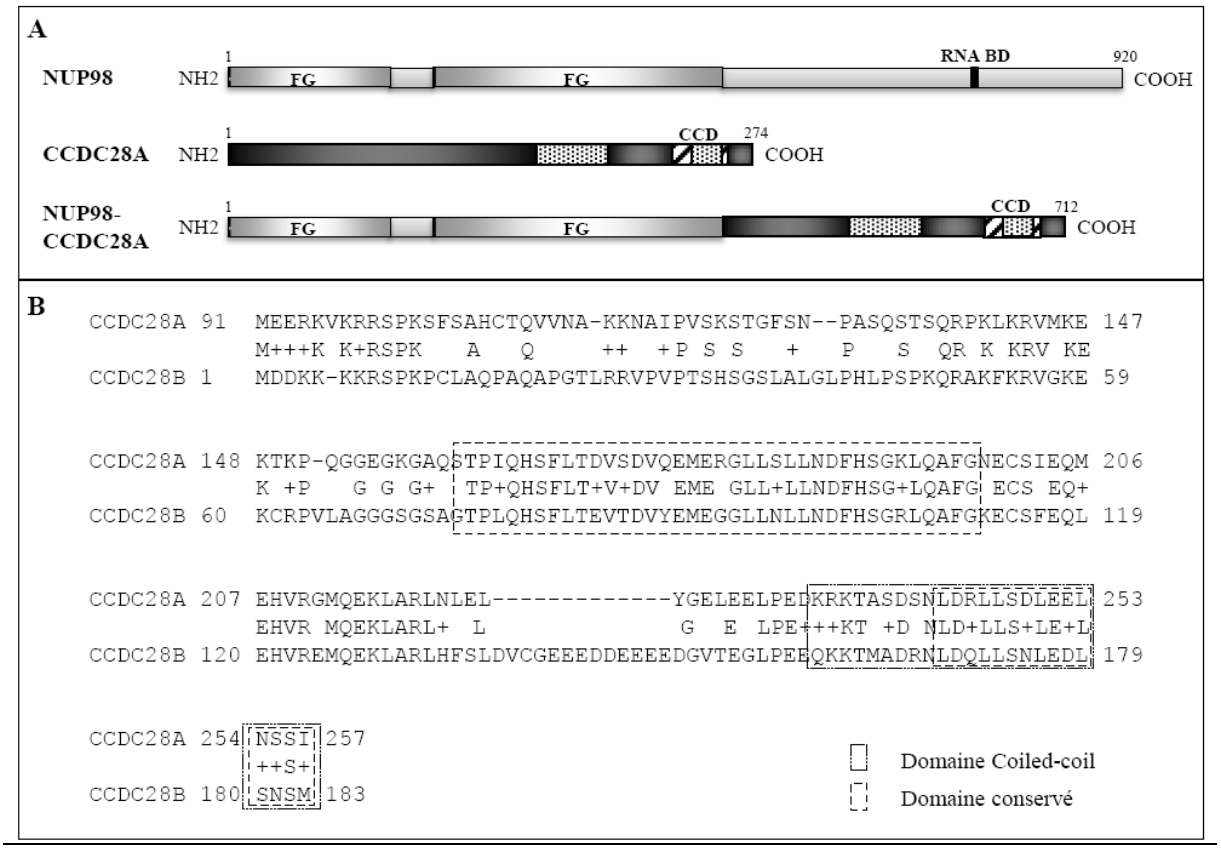


Figure 12. Représentations schématiques de la protéine native NUP98 et de la protéine de fusion NUP98-CCDC28A.

A: NUP98 possède deux domaines répétés FG et un domaine de liaison à l'ARN (RNA BD). La protéine native CCDC28A possède deux domaines hautement conservé (domaines en pointillés) et un domaine coiled-coil (domaine hachuré). La protéine de fusion NUP98-CCDC28A fusionne la partie N-terminale de NUP98 avec ces deux domaines répétés FG et la partie C-terminale de CCDC28A avec les domaines conservés et le domaine coiled-coil. **B**: alignement partiel des protéines humaines CCDC28A et CCDC28B.

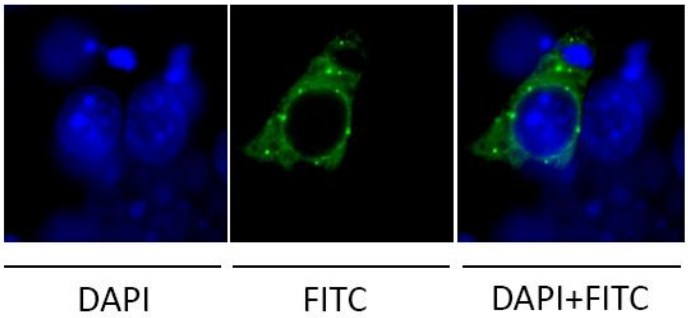


Figure 13. Localisation subcellulaire de la protéine CCDC28A-HA dans les cellules NIH3T3.

La protéine CCDC28A-HA est localisée dans le cytoplasme.

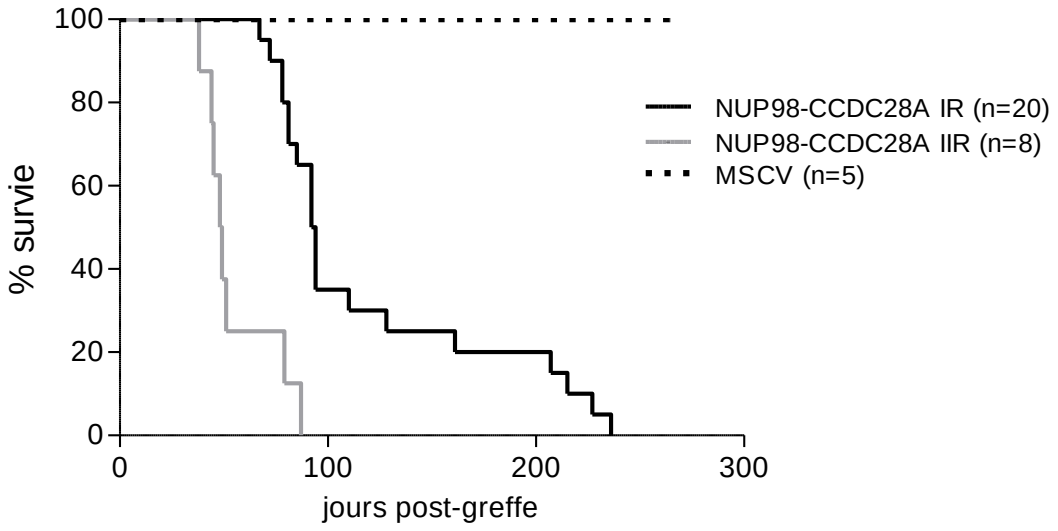


Figure 14. Courbe de survie de Kaplan Meier des souris greffées NUP98-CCDC28A en receveurs primaires et secondaires.

Les souris receveurs primaires exprimant la fusion NUP98-CCDC28A décèdent rapidement avec une médiane de 93 jours post-greffe. Les receveurs secondaires décèdent plus rapidement avec une médiane de 49 jours. Les souris controles MSCV vide restent indemnes.

dans différents tissus, du provirus intact, dans toutes les souris transplantées (non montré). Les analyses clonales des receveurs primaires ont montré la présence des différents clones de cellules transduites par *NUP98-CCDC28A*, au niveau des organes hématopoïétiques (***Figure 15***). Alors que de multiples clones sont présents dans la moelle osseuse des cellules transduites avec un vecteur MSCV vide (***Figure 15, ligne 9***), les leucémies induites par *NUP98-CCDC28A* sont principalement mono ou oligoclonales (***Figure 15, lignes 2, 7 et 13***).

Bien que la leucocytose et la neutrophilie varient entre les souris, les souris NUP98-CCDC28A présentent de manière constante, une anémie et une thrombopénie sévère (***Tableau 4***), ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules immatures ou myéloïdes blastiques dans la moelle osseuse, dans la rate et dans le sang périphérique, comparativement au souris CCDC28A ou MSCV. Les frottis sanguins montrent la présence de précurseurs myéloïdes circulants, ainsi que des neutrophiles matures segmentés (***Figure 16***). La cytologie de la moelle osseuse confirme la prolifération de cellules myéloïdes immatures, avec conservation d'une maturation minimale et la disparition du compartiment érythroïde (non montré). Toutes les souris NUP98-CCDC28A présentaient une hépatosplénomégalie.

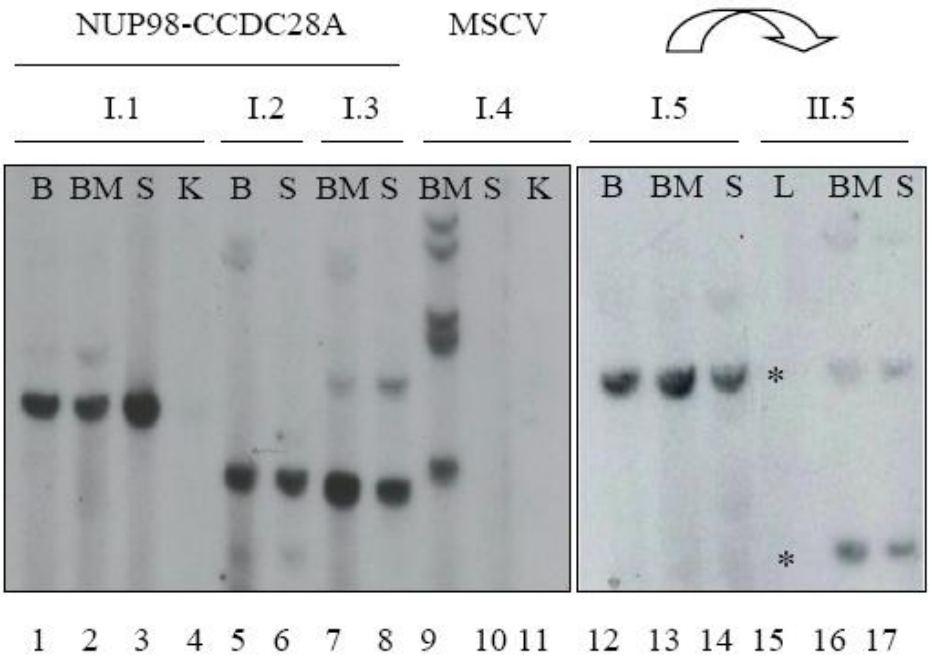


Figure 15 : Etude de clonalité par Southern Blot des souris NUP98-CCDC28A malades comparées au controle.

La souris 1.5 est une souris receveur primaire NUP98-CCDC28A, dont la moelle pathologique a été réinjectée dans la souris receveur secondaire II.5. B : sang ; BM : moelle osseuse ; S : rate; K: rein; L: foie.

	NUP98-CCDC28A I (n=20)	NUP98-CCDC28A II (n=8)	CCDC28A (n=5)	MSCV (n=3)
GFP (%)	80 ± 8	93 ± 6	2 ± 4	10 ± 9
Leucocytes G/L)	67 ± 49	110 ± 72	7 ± 3	8 ± 2
Hémoglobine (g/dl)	6 ± 2	7 ± 3	13 ± 2	13 ± 1
Plaquettes (G/L)	60 ± 39	184 ± 170	635 ± 149	755 ± 354

Tableau 4 : Résultats sanguins des hémogrammes pratiqués chez les souris greffées.

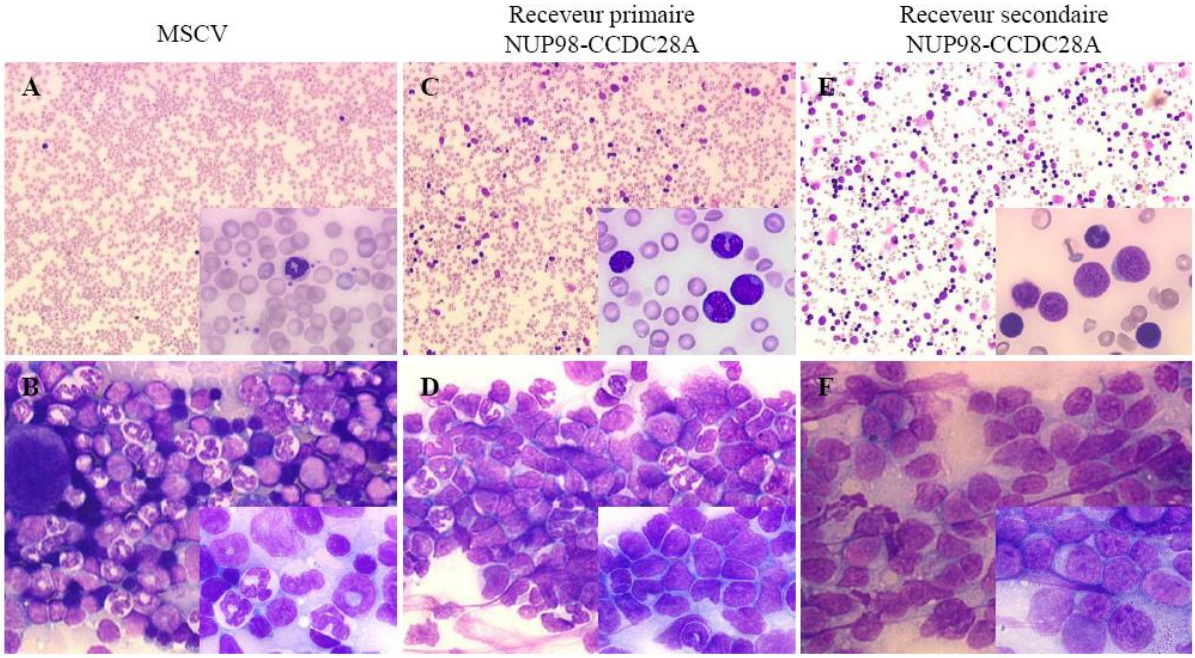


Figure 16 : Etudes cytologiques des frottis sanguins et médullaires (coloration MGG)

La souris controle présente un taux normal de globules blancs circulants (A). La moelle osseuse montre la présence de mégacaryocytes et une différenciation lymphoïde, myéloïde et érythroblastique bien équilibrée (B). La souris receveur primaire NUP98-CCDC28A développe un syndrome myéloprolifératif "MDP-like myeloid leukemia" avec présence de précurseurs myéloïdes circulants (C), enrichissement médullaire en précurseurs myéloïdes immatures, disparition de la différenciation érythroïde et défaut de mégacaryocytes (D). La souris receveur secondaire NUP98-CCDC28A présente une leucémie myéloïde avec maturation ; des blastes sont visibles dans le sang (E), et l'infiltration dans la moelle osseuse est massive (F).

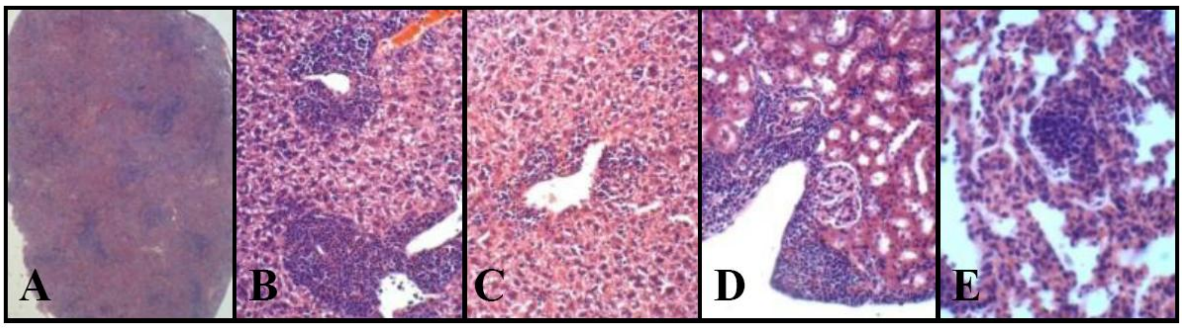


Figure 17: Analyses histologiques d'une souris primaire NUP98-CCDC28A

L'architecture de la rate est détruite par un envahissement cellulaire de cellules myéloïdes plus ou moins matures (A). Infiltration de cellules tumorales dans le foie (B ;C), le rein (D) et le poumon (E).

Les analyses histologiques ont montré une destruction de l'architecture splénique (***Figure 17A***) et une augmentation du nombre de mégacaryocytes (***Figure 17C***), comparativement aux souris CCDC28A ou MSCV. L'impact de l'expression de *NUP98-CCDC28A* sur la mégacaryopoïèse est à considérer, compte tenu de la description d'un cas de leucémie aigue mégacaryocytaire avec translocation t(6;11) (Tosi et al., 2005). Une infiltration tumorale est également observée dans les organes non hématopoïétiques, comme les poumons, le foie, les reins, avec une infiltration périvasculaire par des cellules myéloïdes (***Figures 17E, B et C, D*** respectivement). Selon la classification de Bethesda (Kogan et al., 2002), nous avons conclu que l'expression ectopique de *NUP98-CCDC28A*, dans des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques, induisait une maladie myéloproliférative ou « myeloproliferative disease (MPD)-like myeloid leukemia ». Nous avons également observé des frottis médullaires évoquant des leucémies myéloïdes avec maturation (non montré).

Pour évaluer le pouvoir leucémogène de la maladie, des cellules de moelle osseuse de souris primaires NUP98-CCDC28A, ont été transplantées dans des souris irradiées léthalement, receveurs secondaires. Toutes les souris ont rapidement développé une leucémie myéloïde rapidement létale, en 7 semaines après transplantation (***Figure 14***). Les analyses cytologiques du sang et de la moelle osseuse ont montré des leucémies aigues myéloïdes avec plus de 20% de blastes dans le sang et un envahissement massif dans la moelle osseuse (non montré). L'aspect clonal de la moelle osseuse des receveurs secondaires, superposables à la moelle osseuse des souris primaires, est confirmé par Southern Blot (***Figure 15***, cadrant de droite, souris II.5 (lignes 15-17) issue de la souris primaire I.5 (lignes 12-14)). Le caractère transplantable et rapidement létal, des cellules malades de souris receveurs primaires, greffées chez des souris receveurs secondaires, démontre le potentiel leucémique de la fusion *NUP98-CCDC28A*.

De manière concordante avec les tests de transplantations *in vivo*, la fusion *NUP98-CCDC28A* a montré un fort potentiel transformant *in vitro*. Contrairement, aux progéniteurs transduits par le vecteur MSCV vide ou avec *CCDC28A*, les progéniteurs transduits avec la fusion *NUP98-CCD28A* acquièrent une capacité de prolifération lors des tests clonogéniques en méthycellulose (***Figure 18***), et sont capables de proliférer en culture liquide (non montré). Des cultures ultérieures, en milieu supplémenté uniquement en sérum, a permis l'immortalisation de progéniteurs *NUP98-CCDC28A*, qui prolifèrent sans dépendance aux cytokines et possèdent une morphologie de myéloblastes (non montré).

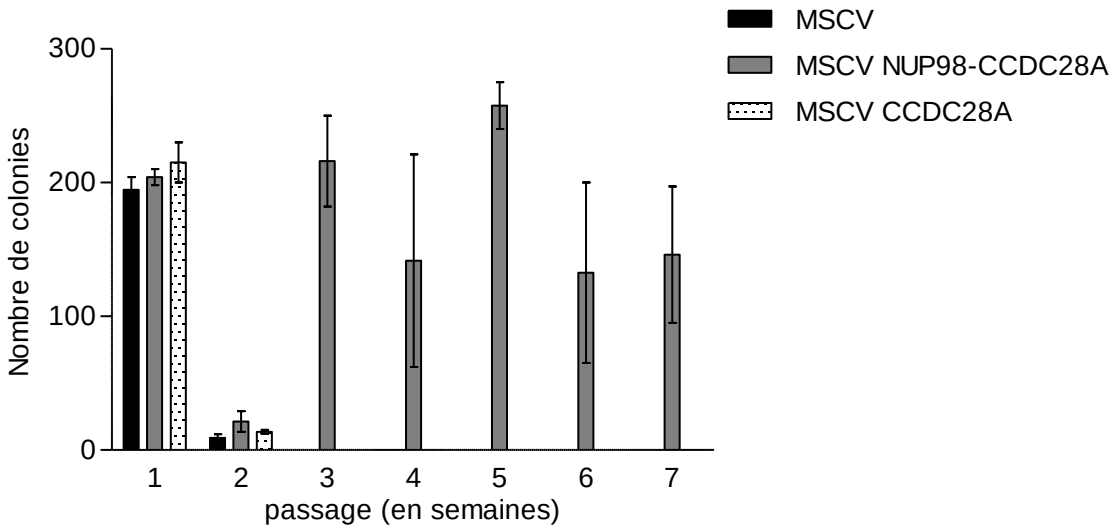


Figure 18 : Tests clonogéniques en méthylcellulose.

Les progéniteurs hématopoïétiques murins, transduits par la fusion *NUP98-CCDC28A*, présentent une capacité accrue de prolifération *in vitro*, contrairement aux cellules transduites par le MSCV ou le gène *CCDC28A*.

Ces résultats suggèrent que l'expression de *NUP98-CDC28A* favorise la prolifération cellulaire et empêche progressivement la différenciation.

La moelle osseuse des souris NUP98-CCDC28A leucémiques est enrichie en progéniteurs granuleux/macrophagiques.

De manière concordante avec les examens cytologiques (***Figure 16***), l'analyse en cytométrie de flux a montré l'augmentation importante des proportions de cellules matures myéloïdes (Mac1/CD11b^{high}, Gr1^{high}) dans le sang périphérique des souris NUP98-CCDC28A receveurs primaires (***Figure 19A***). Cette population possède des composantes monocytaires et granuleuses (non montré). Cette expansion myéloïde est aussi détectée dans la moelle osseuse des souris leucémiques, où les cellules expriment de manière importante des marqueurs myéloïdes de surface avec un pourcentage important de cellules matures (Mac1^{high}Gr1^{high}) et moins matures (Mac1^{low}Gr1^{low}), comparativement aux souris greffée avec le MSCV (***Figure 19B***). Dans leur majorité, les cellules GFP positives coexpriment l'antigène précoce de cellules souches c-Kit^{+} (***Figure 19A***). Les souris NUP98-CCDC28A leucémiques sont significativement infiltrées au niveau splénique et thymique, par des cellules superposables à celles présentes dans la moelle osseuse (non montré). Dans la moelle osseuse des souris

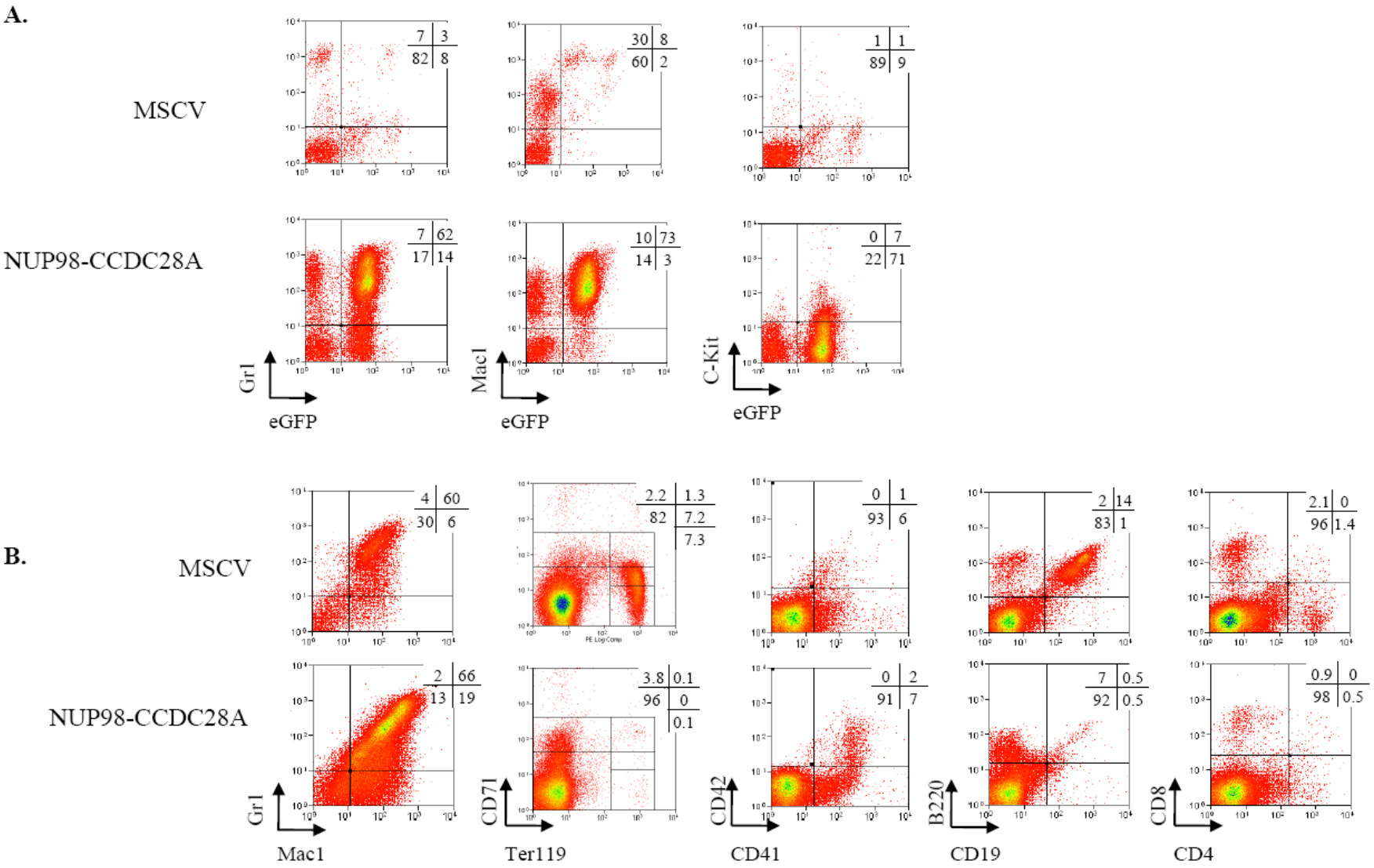


Figure 19. Analyse des marqueurs de surface par cytométrie en flux (A : dans le sang périphérique, B : dans la moelle osseuse)

NUP98-CCDC28A, cette expansion myéloïde était associée avec une réduction de l'érythropoïèse, comme en témoigne la diminution du nombre absolu de cellules érythroïdes ($Ter119^{+}CD71^{+}$), comparativement aux souris contrôles (***Figure 19B***). Les souris NUP98-CCDC28A présentent une lymphopénie concomitante, avec un faible contingent de cellules B (B220, CD19) et T (CD4, CD8).

Afin de mieux préciser, l'origine cellulaire des leucémies induites par *NUP98-CCDC28A*, des analyses en cytométrie de flux ont été réalisées pour étudier les progéniteurs (***Figure 20***). L'isolement de progéniteurs, définis comme des cellules $Lin^{-}Sca1^{-}c\text{-}kit^{+}CD34^{+}Fc\gamma R^{high}$ issus de la moelle osseuse de souris leucémiques, a montré l'expansion sélective d'une population cellulaire enrichie en progéniteurs myélo-monocytaire (GMP) (Akashi et al., 2000), alors que les autres populations de progéniteurs myéloïdes, comme les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et les progéniteurs mégacaryocytaires/érythroïdes (MEP) sont virtuellement absents (***Figure 20***). L'expression de la GFP est détectée aussi bien dans la population de GMP (***Figure 20)*** que dans les cellules leucémiques myélo-monocytaires descendantes (***Figure 19A***). De manière intéressante, la prédominance du compartiment GMP GFP^{+}, parmi les cellules leucémiques de moelle osseuse *NUP98-CCDC28A*, rappelle celle décrite pour certaines fusions *MLL* associées à des leucémies myéloïdes (Cozzio et al., 2003). En complément, en comparaison aux populations normales, les cellules leucémiques médullaires montrent également, une forte diminution de la fréquence des progéniteurs plus primitifs, définis comme $Lin^{-}Sca1^{+}c\text{-}kit^{+}$ (LSK), et qui comprennent les progéniteurs multipotents (MPP), les LT et ST-HSC. Cela indique que *NUP98-CCDC28A* ne favorise pas l'expansion des cellules souches hématopoïériques, ou des MPP, mais plutôt impose un arrêt plus en aval.

Nous nous sommes ensuite posé la question d'une dérégulation de HoxA, dans le processus de transformation induit par *NUP98-CCDC28A*. Les expériences de RT-PCR quantitatives ont comparé les cellules de moelle osseuse complète, provenant de souris leucémiques *NUP98-CCDC28A*, à des souris contrôles *CCDC28A* et MSCV. Les cellules de moelle osseuse de souris malades *NUP98-HoxA9* étaient utilisées comme contrôle positif, et des cellules de souris obtenues de la surexpression d'une forme oncogénique du récepteur à la thrombopoiétine MPL (MPL^{W515L}, (Chaligne et al., 2007)), étant utilisées comme contrôle négatif. Les résultats ont montré une augmentation des transcrits *HoxA9* et *HoxA10*, et plus modestement de *HoxA5* et *HoxA7* dans les receveurs primaires et secondaires, greffés *NUP98-CCDC28A* comparativement aux contrôles (***Figure 21***).

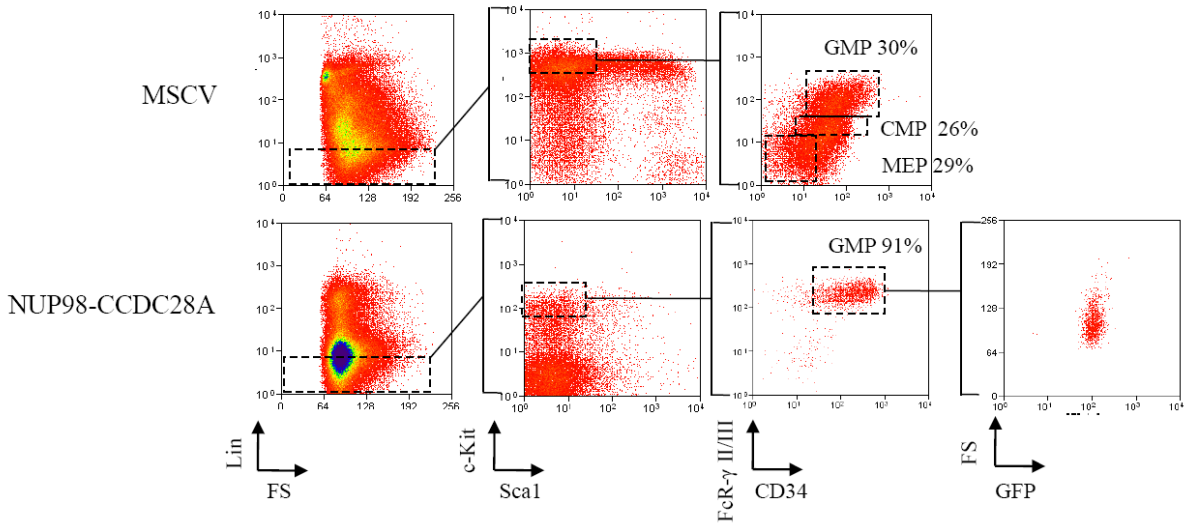


Figure 20. Analyse par cytométrie de flux des progéniteurs hématopoiétiques.

Les souris malades receveurs primaires NUP98-CCDC28A présentent une expansion des GMP et une absence de MEP et CMP en comparaison à la souris contrôle.

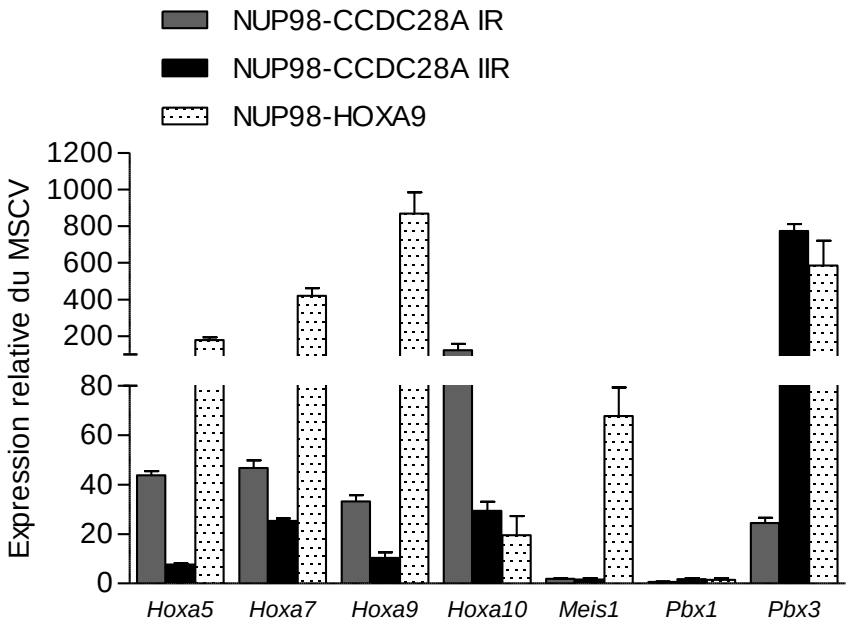


Figure 21. Expression des HOX et cofacteurs chez les souris greffées.

Les résultats sont rendus en pourcentage d'expression relative du profil des souris contrôles MSCV.

Il n'a pas été observé d'hyperexpression concomitante des cofacteurs Hox, Meis1, Pbx1 et Pbx3 dans la moelle osseuse des souris *NUP98-CCDC28A*, alors que cette hyperexpression est présente dans les cellules leucémiques *NUP98-HoxA9*. Ce résultat suggère que l'expression de *NUP98-CCDC28A* n'impacte pas la voie canonique Hoxa-Meis1.

D. Résultats complémentaires

1. Expression des gènes *CCDC28A* et *HMGB3* chez l'embryon humain.

Afin d'évaluer l'expression précoce des gènes *CCDC28A* et *HMBG3* durant l'embryogenèse humaine, des PCR quantitatives ont été réalisées sur de l'ADNc de tissus embryonnaires humains (fournis par le laboratoire du Pr Munich, Necker) et comparées au gène *ABL* (Sondes Applied Biosystems Assay ref. 4331182 ; assay ID: Hs00382571_m1 pour CCDC28A ; assay ID: Hs00801334_s1 pour HMGB3). Ces gènes sont exprimés dans tous les tissus embryonnaires testés, en particulier dans le foie pour CCDC28A et dans le tube neural et la moelle osseuse pour HMGB3 (***Tableau 5***).

Stade de Carnegie	Organe	CCDC28A	HMGB3
14	Foie	52%	24%
	Tube neural	25%	**83**%
	Cœur	21%	22%
	Sac vitellin	35%	15%
	Bourgeons membres	28%	50%
16	Moelle osseuse	17%	**76**%
	Sac vitellin	48%	17%
17	Foie	61%	14%

Tableau 5 : Expression des gènes *CCDC28A* et *HMGB3* dans les tissus embryonnaires humains (comparé à l'expression du gène ABL).

CCDC28A est exprimé principalement dans le foie. HMGB3 est exprimé principalement dans le tube neural à un stade précoce, et dans la moelle osseuse.

2. Etude de la fréquence des remaniements *NUP98-CCDC28A* et *NUP98-HMGB3* dans les hémopathies malignes humaines.

Les remaniements *NUP98* sont rares. Pour tester, la fréquence des fusions *NUP98-CCDC28A* et *NUP98-HMGB3*, une RT-PCR multiplexe a été réalisée sur une population de

cDNA de 139 patients présentant une leucémie aigüe. Les amorces utilisées étaient: NUP98-F (sens): 5'- TTGGCCAACAGAATCAGCAGAC-3', HMGB3-R (anti-sens): 5'-CCGGGCAACTTTAGCAGGAC-3' et CCDC28A-R (anti-sens): 5'-AGCGCCTTTGCCCTCTCC-3'. Après exclusion des patients pour lesquels le caryotype n'était pas disponible, la population comprenait 99 adultes et 18 enfants; 43 patients présentaient une LAL de la lignée B, 1 une LAL de la lignée T et 70 une LAM.

Aucun remaniement n'a été retrouvé dans cette population, confirmant la rareté de ce type de fusion.

3. Etude de l'expression de CCDC28A et HMGB3 dans les hémopathies malignes humaines.

La dérégulation de l'expression de certains gènes, comme les gènes *HOXA*, est impliquée dans les processus de leucémogenèse. Afin d'explorer cet aspect, nous avons réalisé une étude d'expression des gènes *CCDC28A* et *HMGB3*, par RT-PCR quantitative dans les 117 échantillons précédemment décrits.

Préalablement, l'expression de ces deux gènes a été évaluée sur un pool de moelle osseuse de 9 patients sains. Cette expression a été comparée au gène *ABL*.

L'analyse des échantillons montre une variabilité d'expression chez les patients atteints d'hémopathies malignes (***Figure 22***). Quelques malades surexpriment l'un ou l'autre des gènes. Pour HMGB3, nous avons remarqué que son expression est très diminuée chez 45% des patients, en particulier, dans le groupe des patients avec leucémie lymphoblastique B présentant une fusion *BCR-ABL*, sans que nous puissions actuellement apporter d'interprétation à cette observation.

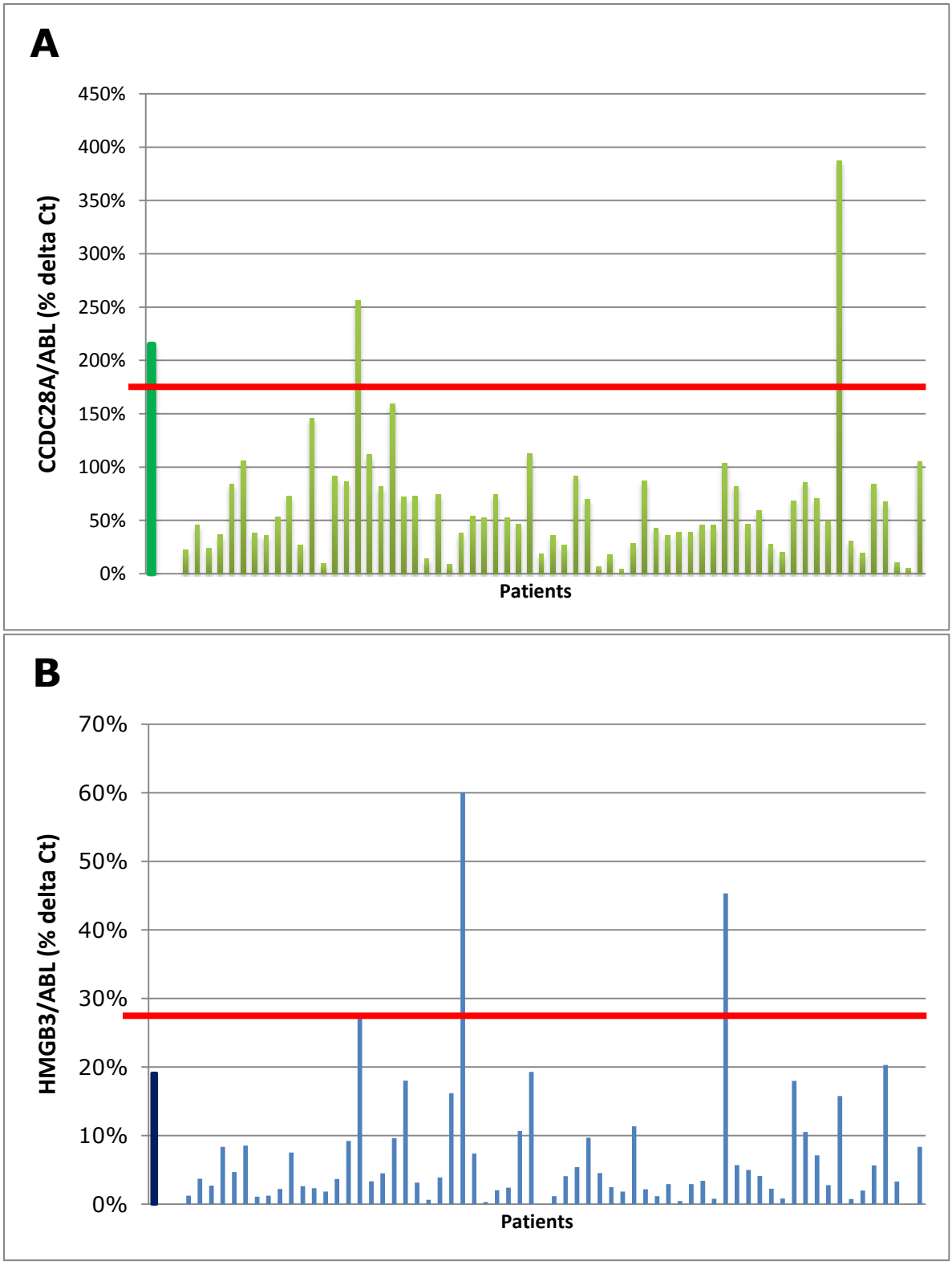


Figure 22: Expression de CCDC28A et HMGB3 dans des échantillons humains de leucémie aigüe. Les barres rouges indiquent l'expression du transcrit sur un pool de moelle osseuse d'individus sains d'hémopathies malignes. Les premières barres verticales, plus foncées, correspondent à l'expression du transcrit chez le patient *NUP98-CCDC28A* pour la figure A et le patient *NUP98-HMGB3* pour la figure B.

4. Etude de la ploïdie chez les souris NUP98-CCDC28A

Il a été montré expérimentalement que NUP98 intervenait avec Rae1 dans le contrôle du « check point » mitotique. L'haploinsuffisance conjointe de NUP98 et Rae1 entraine une séparation prématurée des chromatides sœurs et engendre une aneuploïdie sévère (Jeganathan et al., 2005).

Afin de rechercher, une possible dérégulation de l'APC par la fusion NUP98-CCDC28A, une étude cytogénétique d'une lignée NUP98-CCDC28A, dérivée d'une souris receveuse tertiaire avec leucémie aigüe, a été réalisée.

L'étude de 100 mitoses n'a montré aucune anomalie de la ploïdie (exemple, figure 10).

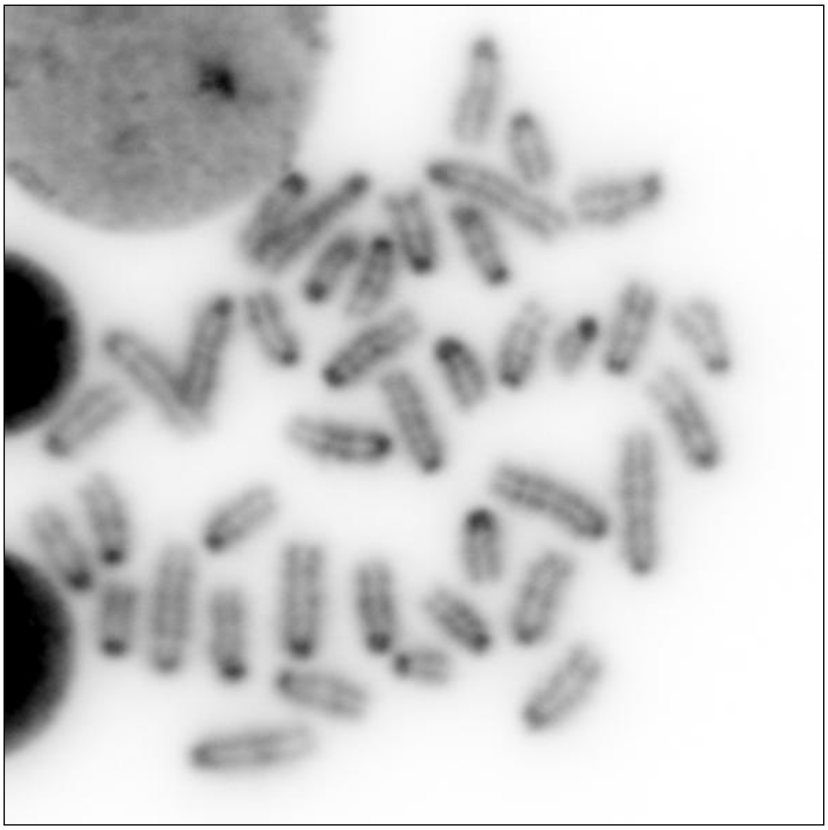


Figure 23 : Caryotype de la lignée immortalisée NUP98-CCDC28A, dérivée de la moelle osseuse d'une souris receveuse tertiaire, présentant une leucémie aigüe. Aucune anomalie de la ploïdie n'est constatée.

IV. DISCUSSION

Au terme de ce travail de thèse, mes résultats, complétés par de nombreuses publications sur les réarrangements *NUP98* (30 nouveaux remaniements de *NUP98* publiés dans la littérature depuis 2006), ainsi que d'autres études réalisées au sein du laboratoire EMI0210 de l'INSERM (Dr. O.Bernard) (DEA de Sophie Kaltelbach et Sophie Dobelstein) (6 patients porteurs de fusions de *NUP98* étudiés au laboratoire), permettent de préciser : le nombre de partenaires de *NUP98*, ainsi que les caractéristiques de leurs produits ; les aspects clinico-biologiques de ces hémopathies malignes ; apporter des éléments nouveaux dans les mécanismes potentiellement impliqués, dans la leucémogénèse liée aux réarrangements du gène *NUP98*.

A. *NUP98* est remanié avec 28 gènes partenaires.

À ce jour et depuis la publication de l'article 1, 33 nouveaux cas d'hémopathies malignes humaines, avec une translocation impliquant *NUP98,* ont été publiés (***Tableau 6***) (Chou et al., 2009; Gorello et al., 2008; Hidaka et al., 2007; Ishikawa et al., 2007; Jankovic et al., 2008; La Starza et al., 2009; Morerio et al., 2006; Pan et al., 2008; Panagopoulos et al., 2007; Petit et al., 2008; Taketani et al., 2009; Tosic et al., 2009; van Zutven et al., 2006; Zhang et al., 2007). Six cas ont été étudiés dans l'unité EMI0210 (Kaltenbach et al., 2010; Petit et al., 2010) (DEA Sophie Kaltelbach-2008 et DEA Sophie Dobbelstein-2009).

La ***figure 24*** présente la liste des 29 gènes partenaires de *NUP98*. Ces partenaires peuvent se classer en quatre groupes, sur la base de leur fonction ou de leur localisation cellulaire. La structure des protéines chimériques, codées par ces gènes, est indiquée dans la ***figure 25***. À noter, que toutes les protéines de fusion conservent la partie N-terminale de NUP98, qui a perdu son signal NLS (Nuclar Localization Signal).

Groupe 1 : les gènes à homéoboites.

39% (soit 60 patients) des partenaires rapportés sont des gènes ***HOX***, tous paralogues des gènes *HOM AbdA* et *B* de la drosophile (***Figure 26***). Dans 63% des cas, il s'agit d'*HOXA9*, soit 25% de toutes les fusions *NUP98* rapportées. Dans 6% des cas, les partenaires sont des gènes à homéoboites de type 2. Il s'agit de ***PMRX1, PMRX* 2**, d'***HHEX*** (hematopoietically expressed homeobox) qui intervient dans l'embryogenèse hépatique

Age	Sexe	Maladie	Caryotype	Remarque	Partenaire	Référence
60	F	LAM-M0	46–47,XX,t(1;17)(q22;q11),t(4;11)(q1?3;p15),?der(8)(p?)[7],del(11)(p12p1?3)[6], del(12)(p11p13),add(14)(q3?2)[7],þ15[3],del(15)(q1?3q2?2)[cp22]/46,XX[4]		*RAP1GDS1*	Van Zutven et al
1	M	LAM-M7	46,XY,der(1)t(1;13)(p36;q1?4),add(11)(p15),der(13)t(1;13)(p36;q1?2),der(21),t(11;21) (p15;p13)[31]/46,XY[7]		*JARID1A*	Van Zutven et al
9	M	LAL-T	46,XY,t(11;18)(p15;q12), del(12)(p11)(15)		*SETBP1*	Panagopoulos et al
4	M	LAM-M2	46,XY,add(5)(q35),del(9)(q22q32),del(11)(p13)[14]/46,XY[4]		*NSD1*	Petit et al
42	M	LAM	Normal (cryptic t(11;17)(p15;p13))		*PHF23*	Reader et al
33	F	SMD	46,XX,t(3;5)(p25;q35)	Fusion NUP98-NSD1 et ANKRD28-NUP98	*NSD1* *ANKRD28*	Ishikawa et al
42	F	Leucémie biphénotypique	47,XX,t(3;11)(q13;p15),+21		*IQCG*	Pan et al
59	M	LAM-t	45, X,-Y,,t(10;11)(q23;p15) [15]/46, XY[5]	ATCD de LAM, I-TOPOII	*HHEX*	Jankovic et al
57	F	LMMC	47,XX,t(4;11)(q12;p15),+8	ATCD de BK, chemotherapy	*GSX2*	Dobbelstein
28	M	LAM-M2	46,XY,t(3;11)(q12;p15)		*LNP1*	Gorello et al
27	H	LAL-T	46,XY,der(11)?t(7;11)(q35;p15),del(12)(p11;p13), ?t(16;17)(q21;q24?)		*BPTF*	Dobbelstein
36	F	LAM-M2	46,XX,t(11;12)(p15;q13)		*Non HOXC*	La Starza et al
59	F	LAM-M4	46,XX,t(11;12)(p15;q13)	FTL3 ITD	*HOXC13*	Tosic et al
60	M	SMD-Rx	46,XY,t(8;11)(p11;p15),del(1)(p22p32)		*NSD3*	Taketani et al
3	F	LMMJ	46,XX,t(7;11)(p15;p15)		*HOXA11*	Mizogushi et al
40	F	LAM-M4	9 patients : t(7;11)(p15;p15) 1 patient: t(2;6)(q37;p22) , t(3;12)(p11;p11.2), t(7;11)(p15;p15) 1 patient: t(7;11)(p15;p15), del(5)(q31q35)	FLT3/ITD, NRAS	*HOXA9*	Chou et al
31	F	LAM-M2			*HOXA9*	Chou et al
25	M	LAM-M2		WT1	*HOXA9*	Chou et al
29	M	LAM-M2			*HOXA9*	Chou et al
59	F	LAM-M2		NRAS, KRAS, WT1	*HOXA9*	Chou et al
23	F	LAM-M2		KRAS, WT1	*HOXA9*	Chou et al
27	F	LAM-M2		FLT3/ITD, WT1	*HOXA9*	Chou et al
28	F	LAM-M2			*HOXA9*	Chou et al
57	F	LAM-M2		FLT3/ITD	*HOXA9*	Chou et al
37	F	LAM-M2			*HOXA9*	Chou et al
55	F	LAM-M2			*HOXA9*	Chou et al
29	M	LAM-M4	46,XY, t(1;21)(p32;q22)		*HOXA9*	Aoki et al

Tableau 6 (1) : Caractéristiques cliniques et cytogénétiques des 33 patients avec réarrangements *NUP98* publiés depuis 2006

Age	Sexe	Maladie	Caryotype	Remarque	Partenaire	Référence
74	M	SMD /LAM-t	46 XY,t(1;11)(q23;p15)[17]/46,XY[3]	Liposarcome pléiomorphique, Chimiothérapie + Rx	*PRRX1*	Zhang et al
0,9	F	LAM-M4	46,XX,t(2;11;9)(q31;p15;q22),t(6;11;15)(q21;q23;q22),t(8;10)(q13;q22)		*HOXD13*	Hidaka et al
12	M	LAM-M5b	46,XY,inv(11)(p15q22)		*DDX10*	Morerio et al
79	M	LAM-M2	46,XY,inv(11)(p15q23)		*MLL*	Kaltenbach et al
30	F	LAM-M2	46,XY,inv(11)(p15q23)		*MLL*	Kaltenbach et al
86	M	SMD	46,XY,t(4;11)(p12;p15)[13]/46,XY[7]		*AF10*	Kaltenbach

Tableau 6 (2) : Caractéristiques cliniques et cytogénétiques des 33 patients avec réarrangements *NUP98* publiés depuis 2006

LAM (-t) = leucémie aigüe myéloblastique (forme secondaire liée à un traitement) ; SMD (-t)= syndrome myélodysplasique (forme secondaire liée à un traitement); LAL-T = leucémie aigüe lymphoblastique de la lignée T ; LMMC (-t) = leucémie myélomonocytaire chronique (forme secondaire liée à un traitement); LMMJ = leucémie myélomonocytaire chronique juvénile ; Rx = radiothérapie.

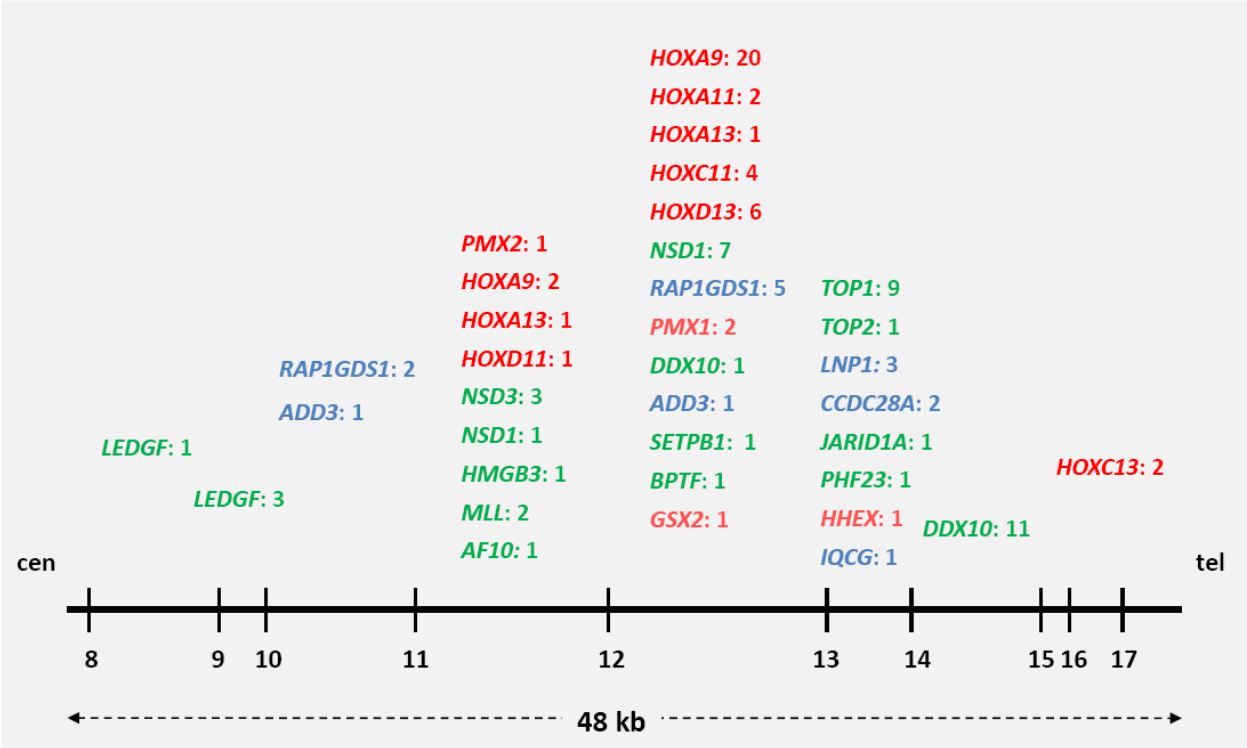


Figure 24 : Localisations des points de cassure sur le gène *NUP98*. Classification des 29 gènes partenaires. Toutes les fusions se situent dans les régions introniques 8 à 16. Le chiffre situé face à chacun des 30 gènes partenaires correspond au nombre de cas recensés pour chacune de ces fusions NUP98-partenaire. Les gènes marqués en rouge sont des gènes à homéodomaine de classe I (rouge foncé) et de classe II (rouge clair) ; les gènes marqués en verts sont des gènes codant pour des protéines nucléaires, les gènes marqués en bleu sont des gènes codant pour des protéines cytoplasmiques.

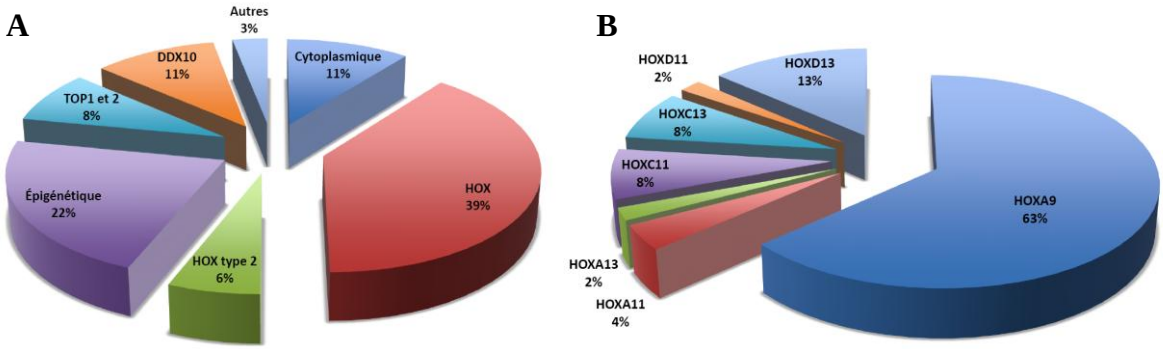


Figure 26. Répartition des gènes partenaires de *NUP98* dans les hémopathies malignes humaines.

Les gènes *HOX* sont impliqués dans 39% des hémopathies. Les fusions *NUP98-HOX* et gènes codant pour des protéines « de la chromatine » représentent près de 70% des fusions *NUP98*. A eux seuls, les fusions avec les gènes à homéobox représentent (45% des fusions) (A). Parmi les gènes *HOX*, le gène *HOXA9* est majoritairement remanié (B).

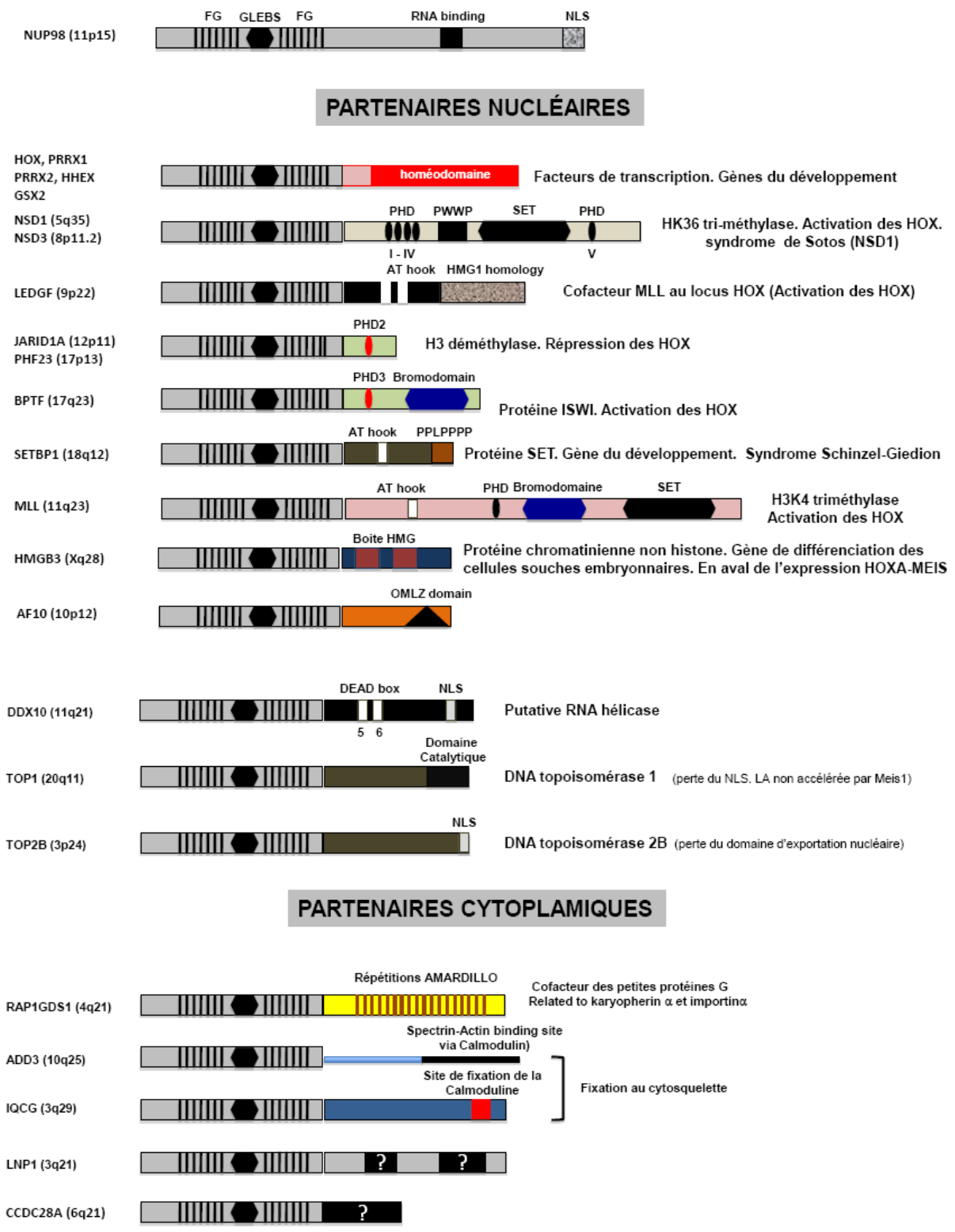


Figure 25. Structures des principales fusions *NUP98-partenaires*.

Les domaines d'interactions protéiques connus sont représentés schématiquement. Les fonctions connues de la protéine partenaire et ses principales interactions dans la cellule sont indiquées.

murine et dans la différenciation de l'hémangioblaste (Jankovic et al., 2008; Kubo et al., 2005; Tanaka et al., 1999) et ***GSX2***, morphogène de l'encéphale chez la souris (DEA de Sophie Dobbelstein en 2009, (Yun et al., 2003)).

Au total, les fusions *NUP98-gènes à homéoboites* représentent **46%** de l'ensemble des fusions *NUP98*. Toutes ces fusions codent pour des protéines chimériques qui présentent la même structure : la partie N-terminale, composée des deux domaines FG de NUP98 (encadrant le domaine GLEBS), fusionnée au domaine HOX.

Groupe 2 : les gènes dont les produits protéiques interviennent dans la régulation de la chromatine.

21% (soit 29 patients) des gènes partenaires de *NUP98*, codent pour des protéines qui interviennent dans la régulation épigénétique des gènes, en participant au contrôle de l'état de repliement de la chromatine.

Dans ce groupe, ***NSD1*** est celui qui est le plus souvent fusionné à *NUP98* (48% des gènes du groupe 2) (14 patients). *NSD1* fait partie de la famille des **N**uclear receptor **S**ET **D**omain-containing qui comprend trois gènes : *NSD1* (5q35), *NSD2* (4p16.3) et *NSD3* (8p11.23). *NSD1* code pour une H3K36 (H3K36 : résidus lysine 36 de l'histone H3 de la chromatine) histone triméthyle transférase. Cette action enzymatique est réalisée par l'intermédiaire de son domaine Set2. Cette triméthylation est une marque d'ouverture de la chromatine (Pokholok et al., 2005). Ainsi, NSD1 favorise-t-il l'ouverture de la chromatine au niveau de ces gènes cibles, dont les *HOX*. En effet, l'invalidation du gène, chez la souris, entraîne des défauts majeurs du développement embryonnaire, associés à l'absence d'expression des gènes *Hoxa1* et *Hoxb1* (Rayasam et al., 2003). En pathologie constitutionnelle, des mutations de *NSD1* sont responsables d'un syndrome associant retard mental et gigantisme, dénommé syndrome de Sotos. ***NSD3*** (3 patients) représente 10% des gènes du groupe 2. Dans ces 2 fusions, la partie N-terminale de NUP98 est fusionnée à la quasi-totalité de NSD1 et NSD3.

LEDGF (Lens epithelium-derived growth factor) représente 14% des gènes de ce groupe (4 patients). Il code pour 2 isoformes, p52 et p75. Ces protéines se fixent à la chromatine par l'intermédiaire de plusieurs motifs, dits crochets AT-hooks, localisés dans leur partie centrale. Elles possèdent dans leur partie C-terminale un motif d'homologie avec la protéine de la chromatine non–histone, HMGB1. Dans leur partie N-terminale, ces deux isoformes, possèdent un domaine PWWP (Yokoyama and Cleary, 2008), séquence conservée d'environ 80 AA, contenant un motif Pro-Trp-Trp-Pro, qui permet aux produits de *LEDGF* de

favoriser l'interaction MLL-Menine, indispensable pour que la protéine MLL se fixe aux loci des *HOX*. De ce fait, *LEDGF* participe au contrôle de l'expression des gènes *HOX*. Cela explique les résultats de Sutherland et al., en 2006, démontrant que les souris Ledgf$^{-/-}$ présentaient une brachycéphalie et plusieurs anomalies du squelette, rappelant certaines mutations des gènes *Hox*. Ces auteurs ont également montré que l'inhibition de l'expression de Ledgf, par interférence ARN dans un modèle cellulaire humain, entrainait une dérégulation des gènes *HOX* du cluster A (Sutherland et al., 2006). Dans les fusions *NUP98-LEDGF*, la partie N-terminale de NUP98 est fusionnée avec la partie centrale et terminale des produits de LEDGF. Le domaine d'interaction PWWP n'est pas présent dans la protéine chimérique.

2 cas de fusions ***MLL*** (7% des gènes du groupe 2) ont été publiés par notre groupe (Kaltenbach et al., 2010). Les fusions *NUP98-MLL* présentent une structure originale par rapport à l'ensemble des fusions *MLL*. Alors que toutes celles décrites jusqu'à présent conservent la partie N-terminale de MLL (voir pour revue (Harper and Aplan, 2008)), les fusions *NUP98-MLL* réunissent la partie N-terminale de NUP98 à toute la protéine MLL, à l'exception, des tout premiers acides aminés formant le domaine de liaison de MLL à la ménine.

AF10, a été trouvé fusionné à *NUP98* par S. Kaltenbach au cours de son DEA (2008) au sein de notre unité. *AF10* est un partenaire de *MLL* dans les translocations t(10;11)(p12;q23) (Chaplin et al., 1995). Il code une protéine ayant, dans sa partie N-terminale, un motif en doigt de zinc, dans sa partie centrale, le motif NLS, puis des crochets AT (AT hooks) et dans sa partie C- terminale, deux motifs octapeptide (OM) et leucine zipper (LZ). L'homologue d'AF10 chez la drosophile interagit avec l'homologue d'HP1 (Heterochromatin Protein 1), qui est associée à la répression transcriptionnelle par hétérochromatisation de certains loci. Par ailleurs, il a été démontré, dans les modèles murins de fusions Mll-Af10, que le domaine OM-LZ était capable de lier DOT1L, seule méthyl transférase capable de triméthyler les résidus lysine 79 (H3K79) de l'histone H3, une marque de la chromatine en conformation ouverte. AF10 est donc une protéine intervenant dans le contrôle de l'expression génique par des mécanismes épigénétiques. Dans la protéine NUP98-AF10, la partie N-terminale de NUP98 n'est fusionnée qu'au domaine OM-LZ d'AF10. Il est à noter que le NLS d'AF10 n'est pas contenu dans la fusion.

JARID1A (ou *RBP2* pour Retinoblastoma binding protein 2) a été rapporté fusionné à *NUP98*, chez un seul malade. C'est un gène qui code une déméthylase spécifique des résidus lysines di ou triméthylées de l'histone H3 (Christensen et al., 2007; Klose et al., 2007). Elle participe donc, à l'établissement, ou au maintien de la conformation fermée de la chromatine.

(Christensen et al., 2007) ont également démontré que l'homologue de Jarid1a, chez la souris et le nématode, participait au programme génétique du développement embryonnaire, en réprimant l'expression des HOX. D'un point de vue structural, c'est la présence des doigts de zinc PHD3, qui permet à la protéine de se fixer aux lysines di ou triméthylées (Wang et al., 2009). Dans la protéine de fusion NUP98-JARID1A, la partie N-terminale de NUP98 est fusionnée avec la partie C-terminale de JARID1A, qui ne contient que le domaine PHD3 (Wang et al., 2009).

PHF23 a été rapporté fusionné à *NUP98* chez un seul patient. Il code une protéine dont la fonction n'est pas connue, mais qui possède également dans sa partie terminale un domaine PHD3. La protéine de fusion NUP98-PHF23 a les mêmes caractéristiques structurales que NUP98-JARID1A (Reader et al., 2007).

BPTF (Bromodomaine PHD Transcription Factor) a été décrit comme étant fusionné avec *NUP98* chez un seul patient par notre équipe (Dobbelstein DEA-2009). C'est l'homologue humain de *NURF301* (NUcléosome Remodeling Factor) de la drosophile, qui code une protéine de la famille des ISWI, intervenant dans le remodelage de la chromatine (Badenhorst et al., 2002; Barak et al., 2003; Xiao et al., 2001). Elle possède un domaine en doigt de zinc de type PHD2, qui lui permet également de se fixer sur les régions du génome riches en lysines triméthylées. Elle possède en plus, dans sa partie toute C-terminale, un domaine BROMO qui lui permet de se fixer sur les régions de la chromatine acétylée. Durant l'embryogénèse, à l'inverse de JARID1A, elle participe au maintien, en conformation ouverte, de la chromatine des loci des gènes *HOX* (Badenhorst et al., 2002; Li et al., 2006)). La protéine chimérique fusionne la partie N-terminale de NUP98 avec les domaines PHD3 et BROMO de BPTF.

SETPB1 a été rapporté fusionné à *NUP98* chez un seul patient (Jenuwein et al., 1998; Panagopoulos et al., 2007). Il code un produit qui contient une région centrale homologue à l'oncoprotéine SKI, un domaine SET en position carboxy terminale et 3 domaines de liaison à l'ADN AT hook (deux encadrant la partie centrale homologue à SKI et une localisée en aval du domaine SET). Enfin, la partie C-terminale contient un domaine riche en proline. Le rôle de SETBP1 n'est pas connu, mais l'existence de ce domaine SET indique que cette protéine intervient dans le contrôle de la conformation de la chromatine. Des mutations de *SETBP1* viennent d'être décrites par séquençage haut débit de l'exome, dans le syndrome malformatif de Schinzel-Guiedon (Hoischen et al., 2010). Ceci atteste du rôle de ce gène dans l'embryogénèse. Dans la fusion *NUP98-SETBP1,* le domaine FG de NUP98 est accollé avec la partie C-terminale de SETBP1, contenant le troisième domaine AT hook et le domaine

riche en proline. Le domaine SET n'est pas compris dans la fusion.

HMGB3 a été décrit fusionné à *NUP98* chez un seul malade que nous avons publié en 2010 (Petit et al., 2010). Il code pour une protéine de la chromatine non histone. HMGB3 est le troisième membre de la famille des protéines HMGB (High Mobility Group du groupe B), qui sont des facilitateurs du remodelage de la chromatine et de l'interaction de celle-ci avec des facteurs de transcription (voir revue par (Travers, 2003)). Dans la protéine de fusion NUP98-HMGB3, la partie N-terminale de NUP98 est fusionnée à toute la protéine HMGB3.

Ce groupe 2 des partenaires de NUP98 est donc composé de gènes codant pour des facteurs intervenant, directement ou indirectement, sur le contrôle de la conformation de la chromatine, soit par modifications des queues d'histone (*NSD1* et *3*, *PHF23*, *JARID1A*, *MLL*, *AF10*, *LEDGF*, *SETBP1*), ou soit par remodelage de la chromatine (*BPTF*), ou sur la courbure de la chromatine (*HMGB3*). Nombreux sont ceux dont le rôle durant l'embryogénèse a été démontré. Ce rôle pour les gènes de la famille *NSD*, pour *JARID1A*, *BPTF*, *LEDGF*, *MLL* passe par une action sur la régulation de l'expression des *HOX*.

<u>Les gènes du groupe 3 interviennent dans le décaténation ou démêlage des molécules d'acide nucléique.</u>

Le groupe 3 est composé des gènes *DDX10*, *TOP1 (*Topo isomérase de type 1*)* et *TOP2B (*Topo isomérase de type 2B*)*. Il constitue 19% de l'ensemble des partenaires de NUP98, 11% pour *DDX10* (14 cas publiés) et 8% pour les *TOPO ISOMÉRASES 1* et *2B* (11 cas publiés, dont un seul, pour *TOP2B*).

La fonction de *DDX10* n'est pas connue. Il code une protéine ayant des boites DEAD (asp-glu-ala-asp), caractéristiques des hélicases des ARN. Il interviendrait donc dans la maturation des ARN. Dans la fusion *NUP98-DDX10*, la partie N-terminale de NUP98 est fusionnée à la partie C-terminale de DDX10 comprenant les deux domaines DEAD et le NLS. Récemment, (Yassin et al., 2010) ont démontré que NUP98-DDX10 était capable d'immortaliser des cellules $CD34^+$ humaines et que cette action était dépendante de l'intégrité du domaine DEAD.

TOP1 et *TOP2B* interviennent toutes les deux dans le démêlage ou décaténation des brins d'ADN, survenant après la duplication. TOP2B constitue l'une des protéines de l'axe des chromatides et agit particulièrement en début de prophase. *NUP98-TOP1* code pour une protéine chimérique, composée de la partie N-terminale de NUP98, fusionnée au domaine catalytique de TOP1. Le domaine NLS est perdu. Dans la fusion NUP98-TOP2B, le domaine

catalytique est perdu. Il y a conservation du NLS, mais perte du domaine d'exportation nucléaire.

Les gènes codant pour des protéines cytoplasmiques.

Ce groupe constitue 11% des partenaires de NUP98 (14 patients rapportés). Il est majoritairement composé du gène ***RAP1GDS1*** (9 patients, 65% des cas), du gène ***ADD3*** (2 patients), de ***LNP1*** (2 patients, thèse de Gwendoline Soler. Juin 2010) et de ***IQCG*** (1 patient rapporté).

RAP1GDS1 code pour la protéine smgGDS, facteur d'échange de guanine, qui stimule la conversion de la forme inactive GDP de plusieurs petites GTPases de la famille ras, à la forme active liée au GTP. Elle possède également de nombreuses répétitions AMARDILLO, qui en fait une protéine de la famille des karyopherin α, dont la fonction est l'importation de protéines vers le noyau. La fusion NUP98-RAP1GDS1 garde en position C-terminale les répétitions AMARDILLO de smgGDS.

ADD3 code pour la sous-unité γ de l'adducine, une protéine favorisant la liaison de l'actine à la spectrine par l'intermédiaire de la Calmoduline.

De même, ***IQCG*** intervient aussi dans l'organisation du cytosquelette en fixant la Calmoduline. Dans les fusions NUP98-ADD3 et NUP98-IQCG, les domaines actifs pour la liaison au cytosquelette sont conservés.

LNP1 est un gène que nous avons cloné dans l'unité (DEA de Caroline Schluth, Thèse de Gwendoline Soler). *LNP1* code pour une protéine cytoplasmique dont la fonction n'est pas encore connue.

Le gène ***CCDC28A*** ne peut pas encore être classé. C'est une protéine cytoplasmique, mais sa fonction est inconnue.

B. *NUP98* dans les hémopathies malignes humaines

L'étude des données cytogénétiques, corrélées aux données cliniques disponibles, permet de préciser quelques éléments épidémiologiques, sur les hémopathies malignes humaines avec réarrangement du gène *NUP98*.

1. Aspects épidémiologiques et cliniques.

L'analyse que nous faisons ici, repose sur l'étude des 129 cas de fusions *NUP98* publiés, augmentés des 3 nouvelles fusions *NUP98* caractérisées dans l'EMI0210 et non encore publiés : *NUP98-GSX2*, *NUP98-BPTF* et *NUP98-AF10*, soit au total 132 cas de fusions *NUP98*.

Les fusions NUP98 sont rares.

L'implication de *NUP98* dans les hémopathies malignes humaines reste donc rare. Quelques études évaluent la fréquence d'un type de fusion (Cerveira et al., 2003; Chou et al., 2009; Kwong and Pang, 1999; Nishiyama et al., 1999). Seule une étude évalue spécifiquement les remaniements *NUP98*, qui sont évalués à 1,7% dans les LAM de l'enfant (Nebral et al., 2005). Concernant les LAL-T de l'adulte, une étude retrouve un transcrit *NUP98-RAP1GDS1* sur 2 des 48 patients explorés, soit 4% (Cimino et al., 2001). L'étude que j'ai réalisée sur la fréquence des deux fusions *NUP98-HMGB3* et *NUP98-CCDC28A*, dans une cohorte d'hémopathies malignes, confirme que ces réarrangements sont rares. Cependant, la population étudiée n'était composée que de 70 hémopathies myéloïdes sur un total de 117 patients et une seule LAL-T.

Les hémopathies avec remaniements NUP98 touchent tous les âges indépendamment de l'origine ethnique.

Les caractéristiques démographiques des patients sont regroupées dans le ***tableau 7***. Historiquement, les premiers cas ont été décrits par des équipes asiatiques, suggérant un facteur ethnogéographique, dans la survenue des hémopathies malignes impliquant *NUP98*. Désormais, l'analyse des cas rapportés permet de montrer que ces hémopathies touchent également les Caucasiens. L'âge médian de survenue d'une hémopathie maligne impliquant *NUP98* est de 31 ans. Les hémopathies secondaires surviennent plus tardivement que les formes primitives. Ces hémopathies sont rares avant l'âge d'un an, et touchent majoritairement les sujets de plus de 18 ans. Il semble exister globalement une discrète

Répartition par âge	Total	%	H	F	Sexe ratio	Médiane d'âge (année)
Tous patients	128		58	70	1,2	38
Inférieur à 1 an	5	4%	3	2	0,7	0,9
Plus de 1 an à 18 ans	32	25%	15	17	1,1	9,5
Supérieur à 18 ans	91	71%	40	51	1,3	47

Répartition par hémopathie	Total	%	H	F	Sexe ratio	Médiane d'âge (année)
Formes de novo	**101**	**79%**	**45**	**56**	**1,2**	**31**
LAM	73	57%	29	44	1,5	36
LAM0/1	*7*	*5%*	*3*	*4*	*1,3*	
LAM2	*37*	*29%*	*11*	*26*	*2,4*	
LAM4	*17*	*13%*	*7*	*10*	*1,4*	
LAM5	*6*	*5%*	*4*	*2*	*0,5*	
LAM7	*2*	*2%*	*1*	*1*	*1,0*	
LAM autre	*4*	*3%*	*3*	*1*	*0,3*	
LA bi-phénotypique	2	2%	1	1	1,0	
LAL-T	13	10%	8	5	0,6	23
MDS	3	2%	1	2	2,0	
LMC	7	5%	4	3	0,8	
LMMC	2	2%	2	0	-	
JMML	1	1%	0	1	-	
Formes secondaires	**27**	**21%**	**13**	**14**	**1,1**	**53**
LAM-t	20	16%	10	10	1,0	
SMD-t	6	5%	3	3	1,0	
LMMC-t	1	1%	0	1		

Tableau 7: Caractéristiques des 128 patients publiés, atteints d'hémopathies malignes, avec remaniements *NUP98.*

prédominance féminine avec un sexe ratio à 1,2 toutes pathologies confondues. Cependant, cette prédominance féminine semble nette dans les LAM primitives, particulièrement dans les LAM de type M2, avec un sexe ratio de 2,4 et de façon étonnante, dans les fusions *NUP98-TOP1* dans lesquelles un seul patient, sur les 10 rapportés, est de sexe masculin.

***Les hémopathies avec des remaniements NUP98 sont majoritairement myéloïdes aigües, de type M2 et primaires* (*Figure 27*).**

Les hémopathies malignes impliquant *NUP98* sont majoritairement primitives et myéloïdes (70% des cas). Les LAM primitives, essentiellement de type M2 et M4,

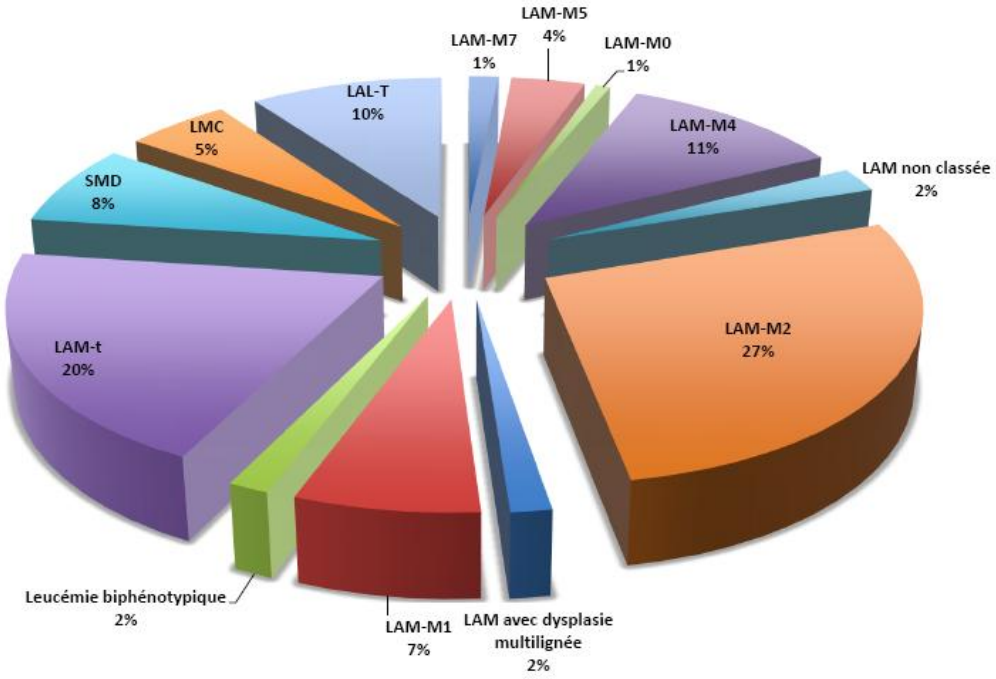


Figure 27. Phénotype des hémopathies malignes associées aux fusions *NUP98.*

90% de pathologies sont de type myéloïde dont 80% de forme primaire, principalement des M2 (30%). 22% sont des formes secondaires de leucémies aigues. LAM (-t) = leucémie aigüe myéloblastique (forme secondaire liée à un traitement) ; SMD (-t)= syndrome myélodysplasique (forme secondaire liée à un traitement); LAL-T = leucémie aigüe lymphoblastique de la lignée T ; LMC= leucémie myéloïde chronique.

représentent 38% des patients. Les LAL de la lignée T représentent 10% des cas et touchent des sujets plus jeunes. Dans les formes secondaires (20% des cas), 16 patients sur les 27 ont reçu un traitement par inhibiteur de la topo isomérase II. Aucun cas d'hémopathie lymphoïde B n'est rapporté à ce jour.

Il existe une corrélation entre le type d'hémopathies malignes et les partenaires de NUP98

La ***figure 28*** représente la corrélation entre le type de partenaire et le type d'hémopathies malignes. On constate que les fusions impliquant les gènes à homéobox (type 1) et ceux codant pour des modificateurs chromatiniens (type 2) sont très majoritairement associés aux hémopathies myéloïdes primaires. En effet, plus de 75% des hémopathies myéloïdes primaires associées à des fusions *NUP98*, le sont avec des fusions impliquant des gènes de type 1 et 2. Les fusions avec les gènes à homéobox ne sont jamais associées aux hémopathies lymphoïdes T. Par contre, dans les hémopathies myéloïdes secondaires, on observe une association nette, avec les fusions impliquant *DDX10* et *TOP 1 et 2*.

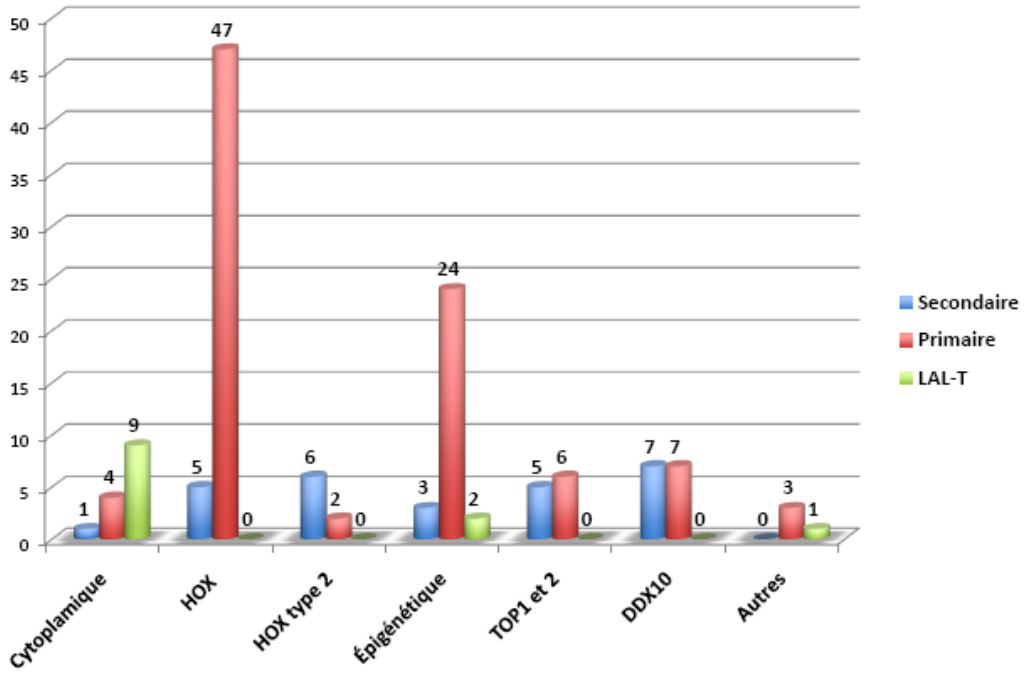


Figure 28. Corrélation phénotype – génotype dans les fusions *NUP98*.

50% des fusions *NUP98-DDX10* et *NUP98-TOP1 et 2* se retrouvent associées à des hémopathies malignes secondaires. Les hémopathies lymphoïdes T sont le plus souvent associées aux fusions impliquant des protéines cytoplasmiques. En particulier, sur les 10 fusions impliquant *RAP1GDS1*, 9 sont associées à une LAL-T et une seule à une LAM de type M0.

2. Aspects cytogénétiques

Au plan cytogénétique, l'aspect le plus remarquable des remaniements impliquant le gène *NUP98* est l'existence de caryotype simple (moins de 3 anomalies chromosomiques) dans la très grande majorité des cas. En particulier (voir article 1), le caryotype retrouvé dans les hémopathies secondaires est également simple, à la différence des caryotypes classiquement associés à ce type d'hémopathies. Seul, sur les 132 cas étudiés dans notre étude, le patient décrit par Van Zutven et al. en 2006, qui présente une LAM de type M0 associée à une fusion *NUP98-RAP1GDS1*, a un caryotype avec plus de 3 anomalies dans le clone initial. Cette particularité des caryotypes des fusions *NUP98* suggère que les fusions

NUP98 sont relativement précoces dans le processus de leucémogénèse. Elle indique également, que malgré le rôle de *NUP98* dans le maintien du point de contrôle mitotique, l'existence d'une seule copie sauvage de *NUP98* et la présence de protéines de fusion impliquant NUP98 n'entrainent pas d'anomalie de la ségrégation mitotique des chromosomes, comme nous le montre également le caryotype des blastes des souris *NUP98-CCDC28A*. Cela est cohérent avec les données expérimentales de (Jeganathan et al., 2005) montrant que seules les souris doubles hétérozygotes $Nup98^{+/-}$ et $Rae^{+/-}$ présentent des aneuploïdies.

La situation sub-télomérique, du gène *NUP98* (3,8 Mb du télomère) et de plusieurs de ses partenaires, rend parfois difficile la détection des réarrangements chromosomiques impliquant *NUP98*. C'est en partie le cas de la fusion *NUP98-NSD1* qui est en général cryptique, compte tenu de la localisation télomérique de *NSD1* (4,5 Mb du télomère). Le caryotype est alors interprété comme normal, sauf dans de rares cas, dans lesquels plusieurs chromosomes sont remaniés, ou lorsque les remaniements sont complexes, comme cela a été décrit dans l'article 2. C'est aussi le cas pour les translocations t(X;11)(q28;p15) et la t(11;17)(p15;p12) fusionnant respectivement *NUP98-HMGB3* et *NUP98-PHF23*. Dans la t(X;11)(q28;p15) du fait de la localisation d'*HMGB3*, à 4,9 Mb de l'extrémité télomérique du chromosome X, les fusions *NUP98-HMGB3* sont difficiles également à détecter avec les techniques de bandes du caryotype. Il est probable que la fréquence de cette fusion soit sous-estimée de même que celle de *NUP98-PHF23*. En effet, d'une part *PHF23* est localisé à 7 Mb de l'extrémité télomérique 17p13, d'autre part, l'aspect au caryotype de la bande 11p15 est identique à celui de la bande 17p13. Seule une large étude menée par FISH, avec une sonde *NUP98*, sur plusieurs centaines de cas avec un caryotype normal, pourrait permettre de détecter et d'établir la fréquence des fusions cryptiques remaniant *NUP98*.

3. Aspects moléculaires

Les points de cassure dans *NUP98* sont principalement rassemblés dans trois introns, les n°11, n°12 et n°13. Nous avons caractérisé les points de cassure de la fusion *NUP98-CCDC28A*. Chez notre malade, comme celui publié par (Tosi et al., 2005), le point de cassure est localisé dans l'intron n°13. Cet intron est particulièrement riche en éléments répétés, Alu, MIR, LINE et MER, qui constituent 53% de sa séquence (Panagopoulos et al., 2002). Les études moléculaires des translocations impliquant cet intron n'ont été documentées que dans les translocations t(11;20) impliquant *TOP1* (Ahuja et al., 1999; Chen et al., 2003; Iwase et

al., 2003; Panagopoulos et al., 2002; Potenza et al., 2004) et un des patients porteurs de la t(3;11)(q12;p15), exploré par Caroline Schluth lors de son travail de DEA au laboratoire en 2007. De façon étonnante, les points de cassure de cette t(3;11) et ceux des t(11;20) surviennent dans le même élément Alu Sg/x. L'existence d'un point de cassure situé dans la même séquence Alu, chez ces 3 malades aux phénotypes différents (LAL T pour le patient 2, syndrome myélodysplasique secondaire pour le cas 1138 (Ahuja et al., 2000a) et LAM primitive pour le cas 4 (Iwase et al., 2003)), laisse penser que cette séquence Alu pourrait être une cible privilégiée (pour des raisons encore inconnues) de remaniements chromosomiques.

4. Pronostic des hémopathies malignes impliquant *NUP98*

Les hémopathies malignes impliquant *NUP98* sont souvent associées à un pronostic défavorable dans les cas cliniques rapportés. La fréquence des formes immatures de LAM et d'hémopathies secondaires d'une part, la fréquence des fusions dérégulant les *HOX*, connues pour leur impact pronostique défavorable d'autre part, peuvent probablement expliquer partiellement cette gravité. Une étude de cohorte a comparé 11 patients atteints de LAM avec fusion *NUP98-HOXA9*, à 482 patients, présentant des LAM non *NUP98* remanié. Les auteurs montrent un âge de survenu plus précoce, une prédominance féminine, un risque de rechute supérieur et une survie inférieure, pour les patients présentant une LAM avec fusion *NUP98-HOXA9*. Par ailleurs, ils mettent en évidence une fréquence plus marquée de mutations associées des gènes *KRAS* et *WT1* (Chou et al., 2009). Des anomalies d'expression et/ou des mutations de ces deux gènes sont décrites dans les LAM. Les mutations de *WT1* sont associées à un mauvais pronostic (King-Underwood and Pritchard-Jones, 1998; Renneville et al., 2009). Bien que les mutations de *KRAS* ne semblent pas impacter le pronostic des LAM, elles entrainent une activation constitutive de la protéine, ce qui pourrait permettre de favoriser la prolifération tumorale (Bowen et al., 2005). L'association entre *NUP98-HOXA9* et les mutations *WT1* et *KRAS* suggèrent, que l'altération de ces deux derniers gènes, pourrait interagir avec *NUP98-HOXA9* dans l'accélération de la leucémogénèse et entrainer un pronostic plus péjoratif de ces leucémies. Dans l'hypothèse de la coopération oncogénique nécessaire au processus de transformation multi-étapes des LAM, les mutations de *KRAS* seraient des mutations de classe I, alors que la fusion *NUP98-HOXA9*, qui cible les *HOX* impliqués dans la différenciation, appartiendrait aux altérations de classe II (Chou et al., 2009).

C. Aspects fonctionnels des fusions *NUP98*.

NUP98 est un gène à multipartenaires dans les hémopathies malignes. Comme nous l'avons expliqué en introduction, cela suggère des mécanismes oncogéniques communs à ces fusions. C'est pour contribuer à la compréhension de ces mécanismes que nous avons, au cours de mon travail de thèse, modélisé les fusions : *NUP98-HMGB3* et *NUP98-CCDC28A*.

Afin de situer ce travail par rapport aux données actuelles sur les mécanismes oncogéniques médiés par les fusions *NUP98*, nous résumerons dans un premier temps les données de la littérature obtenues à partir de l'étude des modèles murins de fusions *NUP98*.

1. Que nous apprennent les modèles murins à propos des fusions *NUP98* ?

D'un point de vue fonctionnel, quatre types de fusion ont jusqu'à ce jour été étudiés après modélisation murine.

a) Dans les ***fusions NUP98-gènes à homéoboite*** (*NUP98-HOX*, *NUP98-HHEX* et *NUP98-PRRX1),* il a été démontré qu'elles codaient pour des facteurs de transcription, capables de maintenir l'expression d'*Hoxa9 et d'Hoxa7* dans les cellules blastiques (Calvo et al., 2002; Hirose et al., 2008; Jankovic et al., 2008). *HOXA9* est un gène qui, avec *Hoxa7* et *Meis1* (cofacteur des *Hox*), fait partie du programme génétique d'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques (Calvo et al., 2002; Ghannam et al., 2004; Hirose et al., 2008; Jankovic et al., 2008; Kroon et al., 2001; Palmqvist et al., 2007; Pineault et al., 2005; Pineault et al., 2004). Il a été montré que cette action des « Nup98-Protéines à domaine Homéoboîte », était liée à leur fixation sur le promoteur de *Hoxa9* et à celle des protéines acétyl-tranférases Cbp et p300, fixées sur la partie FG de la protéine chimérique (Kasper et al., 1999). La présence de ces protéines entraîne une acétylation du locus d'*Hoxa9*, ce qui permet de maintenir la chromatine de ce locus, en conformation ouverte, générant ainsi l'expression dérégulée du gène *Hoxa9* et le blocage de différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Pineault et al., 2004). De façon remarquable, dans tous les modèles murins, la protéine chimérique entraine l'apparition progressive d'une maladie myéloproliférative, se transformant en leucémie aiguë tardivement (9 mois après la greffe de progéniteurs murins, transduits avec un vecteur rétroviral, contenant le transcrit de fusion et greffés à des souris irradiées). (Pineault et al., 2003) ont démontré que le délai de survenue des leucémies aiguës

pouvait être considérablement raccourci en coexprimant les fusions Nup98-Hox avec le cofacteur Meis1. Des résultats totalement similaires avaient été obtenus par (Kroon et al., 1998), sur des souris greffées par des cellules souches exprimant Hoxa9 et Meis1, conformément à la collaboration d'Hoxa9 et de Meis1, dans le maintien des HSC (voir introduction).

b) La ***fusion Nup98-Nsd1*** est une autre fusion étudiée sur le plan fonctionnel. Comme nous l'avons expliqué précédemment, la protéine de fusion contient les répétitions FG de NUP98 fusionnées à la quasi-totalité de NSD1 dont les domaines PHD de fixation à l'ADN et son domaine SET2 capable de triméthyler la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36). Wang et al. ont démontré en 2007, par des expériences de Chip (Chromatine ImmunoPrecipitation), que Nup98-Nsd1 se fixait au niveau des promoteurs des gènes *Hoxa5*, *Hoxa7*, *Hoxa10* et *Meis1* par l'intermédiaire des domaines PHD et triméthylait H3K36 au niveau des promoteurs de ces gènes (Wang et al., 2007). Cette trimétylation de H3K36 maintient la chromatine en conformation ouverte et génère le maintien inapproprié de l'expression des gènes *Hoxa5*, *Hoxa7*, *Hoxa9* et de *Meis1*. Dans ce modèle, la survenue dans les souris greffées d'une leucémie aiguë est rapide en moins de 3 mois.

c) Les ***fusions Nup98-Jarid1a et Nup98-Ph23*** ont elles aussi été modélisées. Elles codent toutes les deux pour des protéines de fusion constituées des répétitions FG de NUP98 et du domaine PHD de la famille des PHD3, qui permet la fixation de la protéine aux régions de la chromatine triméthylée, au niveau des lysines 4 des histones H3 (H3K4, Lysine 4 des Histones 3). Très récemment, Wang et al. ont démontré dans des modèles murins qu'il suffisait de fusionner un domaine PHD3 aux répétitions FG de NUP98, pour obtenir une protéine à forte activité oncogénique. Ces auteurs ont également démontré que, comme pour les fusions *Nup98-Nsd1*, cette activité oncogénique est associée au maintien de l'expression d'*Hoxa5*, *Hoxa7*, *Hoxa9* et *Meis1* dans les cellules blastiques (Wang et al., 2009).

d) Enfin, la ***fusion NUP98-Topoisomerase1*** fut modélisée chez des souris greffées par Gurevich et al en 2004. Ces auteurs ont démontré la survenue chez ces souris, de leucémies aigües fatales, 7 mois après la greffe. Les auteurs ont montré que l'activité oncogénique ne dépendait pas de l'activité catalytique de la topoisomérase et que la transformation cellulaire n'était pas accélérée par la coexpression de Meis1.

En résumé, ces études montent que le maintien de l'expression des Hox, en particulier d'Hoxa9, est un des mécanismes oncogéniques des fusions de *NUP98* avec les gènes du groupe 1 et 2. En effet, on peut raisonnablement émettre l'hypothèse qu'à l'instar des fusions Nup98-Hox, Nup98-Hhex et Nup98-Pmrx1, les fusions Nup98-Pmrx2 et Nup98-Gsx2 ont le même type de fonctionnement. De même, les fusions de Nup98 avec Bptf et Nsd3, qui codent aussi des protéines régulant l'expression des HOX durant le développement et dont la fusion avec NUP98 code des produits structurellement ressemblants, Nup98-Jarid1a et Nup98-Nsd1, peuvent également déréguler l'expression des HOX. Dans le cas de la fusion avec les gènes du groupe 1, la survenue tardive dans les modèles murins, est liée à la nécessité de la survenue d'un deuxième événement génétique, l'hyperexpression de Meis1 par exemple. Dans le cas de la fusion avec un gène du groupe 2, la dérégulation de l'expression des Hox et de Meis1 étant concomitante, la survenue d'une leucémie aiguë est plus rapide. Ceci est lié à la propriété des modificateurs de la chromatine, d'agir sur de nombreux gènes. Cette situation rappelle celle retrouvée avec les modèles murins de fusion *MLL*, dans lesquels la dérégulation simultanée des Hox et de Meis1, s'accompagne de la survenue d'hémopathies aigües rapidement fatales. Les gènes du groupe 1 et 2 constituant 65% des partenaires de *NUP98*, la dérégulation des gènes *HOX*, dans les progéniteurs hématopoïétiques, est un des mécanismes oncogéniques les plus fréquents des fusions *NUP98*. Cependant, le modèle murin de NUP98-TOP1 ne semble pas suivre ce modèle, car la coexpression de MEIS1 n'accélère pas la survenue d'une hémopathie fatale. Cela signifie que la voie oncogénique, médiée par la dérégulation des HOX, n'est pas la seule activée par les fusions *NUP98*.

Que nous apporte la modélisation murine des fusions *NUP98-HMGB3* et *NUP98-CCDC28A* dans la compréhension de la leucémogénèse des fusions *NUP98* ?

2. Étude fonctionnelle de la fusion *NUP98-HMGB3*

HMGB3 est un gène du groupe 2 des partenaires de NUP98, qui intervient dans le programme génétique de l'hématopoïèse

HMGB3, avec *HMGB 1 et 2*, codent pour une sous-famille de la superfamille des protéines à boite « HMG» : « high-mobility group DNA-binding protein». Ce sont des protéines non-histones associées à la chromatine. Elles lient l'ADN sans spécificité de

séquence. Il a été démontré, que les protéines Hmgb1 et 2 pouvaient interagir avec des protéines liant l'ADN, comme les protéines de la famille Hox et Oct, les récepteurs stéroïdes, Rag1 et 2, Rel et p53. Contrairement à *Hmgb1* et *2*, dont l'expression est ubiquitaire, *hmgb3* chez la souris adulte est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques, dans les progéniteurs primitifs et dans la différenciation des cellules érythroïdes. Sa surexpression dans des cellules hématopoïétiques murines inhibe la différenciation des cellules B et de certaines cellules myéloïdes, suggérant que la baisse de son expression est nécessaire pour la différenciation normale de ces précurseurs (Nemeth *et al.*, 2003). Chez les souris transgéniques knock-out pour *hmgb3*, on constate une baisse des progéniteurs communs lymphoïdes et myéloïdes. Ces données suggèrent que le déficit en *Hmgb3* altère le taux de génération et de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques (Nemeth *et al.*, 2005). *Hmgb3* intervient également dans le destin des cellules souches hématopoïétiques (Nemeth et al., 2006).

Des travaux récents ont démontré qu'*Hmgb3* faisait partie d'un programme pouvant être assimilé à celui des cellules souches embryonnaires (programme ESC), dont l'expression est liée à un mauvais pronostic dans divers cancers humains (Ben-Porath et al., 2008; Wong et al., 2008). Somervaille et al. ont démontré, en comparant le transcriptome de cellules leucémiques murines Mll-Af10 ckit^{+} (compartiment enrichi en cellules souches leucémiques (CSL)), à celui de cellules Mll-Af10 ckit^{-}, que le programme ESC était particulièrement exprimé dans les CSL murines Mll-Af10 (Somervaille et al., 2009). Ces auteurs ont démontré également que ce programme était physiologiquement exprimé, de façon transitoire, dans les progéniteurs myéloïdes. Ce programme s'exprimait de façon permanente, en réponse à la présence de l'oncogène et conférait alors aux progéniteurs, des propriétés d'autorenouvellement, avec un arrêt de leur différenciation. Ces travaux ont également montré que 3 gènes, *Hmgb3*, *Cbx5* et *Myb* étaient des gènes maitres de ce programme. En effet, des tests clonogéniques en methyl cellulose, sur des cellules c-kit^{+} murines transduites par ces 3 gènes, montrent que leur coexpression était suffisante pour entrainer une immortalisation de ces cellules, indépendamment de l'expression de *Meis1* et d'*Hoxa9*, cible de l'oncogène Mll-af10. Les auteurs en déduisent que durant l'hématopoïèse normale, l'expression des gènes du programme ESC est transitoire dans les précurseurs hématopoïétiques, du fait de l'extinction physiologique de *Meis1* et *Hoxa9*. Au contraire, en présence de Mll-af10 et d'autres fusions Mll, il n'y a pas de répression de l'expression de *Meis1* et d'*Hoxa9*, ce qui entraine le

maintien du programme ESC, l'apparition de CSL et de la leucémie (Somervaille et al., 2009).

NUP98-HMGB3 ne dérégule pas l'expression du couple Hoxa9-Meis1.

L'étude in vivo, chez la souris irradiée, greffée par des progéniteurs hématopoïétiques (Lin^-), infectés par un vecteur MSCV-IRES-GFP contenant la fusion *Nup98-Hmgb3*, montre que les animaux développent un syndrome myéloprolifératif rapidement mortel, transplantable chez des receveurs secondaires. Cette capacité de transformation est plus rapide que celle des fusions avec les gènes partenaires de *NUP98* du groupe 1, et s'accorde bien avec le modèle des fusions *NUP98* avec les gènes partenaires du groupe 2. Cependant, l'étude de l'expression des gènes *Hoxa9* et *Meis1* dans les blastes des souris malades indique une faible expression de *Hoxa9* et une absence de surexpression de *Meis1*. De ce fait, le pouvoir oncogénique de la fusion *Nup98-Hmgb3* ne passe pas par l'activation de la voie canonique *Hoxa9 –Meis1*.

NUP98- HMGB3 dans la leucémogénèse

La fusion *NUP98-HMGB3*, décrite dans une LAM secondaire, est la première description d'une anomalie génétique impliquant le gène *HMGB3* en pathologie humaine. Comme nous l'avons vu précédemment, elle code une protéine contenant les domaines FG de la partie N-terminale de NUP98, fusionnée à toute la protéine HMGB3 et dont les cibles géniques sont celles d'HMGB3. Nous émettons l'hypothèse que les domaines FG de la protéine de fusion, en recrutant les acétyl-transférase CBP/P300, contribue au maintien de l'ouverture des loci des gènes cibles d'HMGB3, ce qui, compte tenu du rôle d'HMGB3, contribue à la transformation cellulaire, indépendamment de la dérégulation de l'expression *d'HOXA9* et de *MEIS1*.

Une étude par Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip (Chip on chip), réalisée à partir de cellules murines $cKit^+$ Nup98-Hmgb3, permettrait l'étude des cibles de cette protéine de fusion.

3. Étude de la fusion *NUP98-CCDC28A*

CCDC28A code pour une protéine nucléaire de fonction inconnue

Le gène *CCDC28A* code pour une protéine à domaine coiled-coil, non apparentée à une famille de protéine connue. Il est exprimé dans l'ensemble des tissus humains adultes et dans

le placenta. La protéine *CCDC28A* est de localisation nucléaire. Elle possède deux domaines conservés avec une protéine humaine, codée par le gène *CCDC28B,* situé en 1p35.1. *CCDC28B*, aussi appelé *MGC1203*, est muté chez 6% des patients souffrant du syndrome de Bardet-Biedl, maladie syndromique conséquence d'une ciliopathie. CCDC28B colocalise dans les structures péricentriolaires avec les autres protéines BBS, impliquées dans le syndrome de Bardet-Biedl (Badano et al., 2006). Les études in silico montrent que *CCDC28A* est conservé chez les vertébrés. Chez la drosophile, seul le premier domaine est conservé.

La fusion NUP98-CCDC28A entraine chez la souris une hémopathie maligne myéloïde rapidement fatale indépendamment du couple Hoxa9-Meis1.

L'étude in vivo, chez la souris irradiée, greffée par des progéniteurs hématopoïétiques (Lin^-), infectés par un vecteur MSCV-IRES-GFP contenant la fusion Nup98-Ccdc28a, montre que les animaux développent un syndrome myéloprolifératif rapidement mortel, transplantable chez des receveurs secondaires. Comme pour la fusion Nup98-Hmgb3, Nup98-Ccdc28a n'implique pas la voie canonique Hoxa9 et Meis1.

CCDC28A dans les hémopathies humaines

L'absence de fonction connue pour CCDC28A rend plus difficile l'élaboration d'hypothèse dans les mécanismes de transformation. L'hyperexpression isolée de *CCDC28A*, dans des progéniteurs hématopoïétiques (Lin^-), infectés par un vecteur MSCV-IRES-GFP-CCDC28A avec un épitope HA, n'a pas de propriété transformante. Néanmoins, une hyperexpression de *CCDC28A* est retrouvée dans des échantillons de leucémies aiguës.

Les deux fusions que nous avons étudiées constituent deux modèles murins de fusions Nup98 à transformation rapide. Elles se rapprochent des modèles murins des fusions Nup98-gène de type 2. Cependant, à la différence des modèles rapportés dans la littérature, elle ne semble pas utiliser la voie Hoxa9-Meis1. Cela signifie que les voies oncogéniques recrutées par les fusions *NUP98* ne sont pas uniquement celles passant par l'activation inappropriée et constitutive des gènes *HOXA9* et *MEIS1*. Ces résultats vont dans le sens de ceux récemment publiés par Sophie Kaltenbach sur la fusion *NUP98-MLL,* dans lesquelles les blastes ne surexpriment pas les *HOX* et *MEIS1* (Kaltenbach et al., 2010). De même, les travaux de thèse de Gwendoline Soler montrent également que la fusion Nup98-Lnp1 (Lnp1 codant une protéine cytoplasmique) ne cible pas le gène Meis1.

E. Conclusion

Les données actuelles concernant les fusions *NUP98* mettent en évidence les caractéristiques suivantes :

Même si *NUP98* est un gène à multipartenaires, les fusions *NUP98* sont rares dans les hémopathies malignes. Elles n'ont jamais été rapportées dans des hémopathies malignes B, mais surviennent dans des hémopathies malignes myéloïdes (90% des cas) et lymphoïdes T. Ces fusions sont générées par des remaniements chromosomiques, essentiellement des translocations, événements souvent isolés dans le caryotype, indiquant qu'elles interviennent de façon majeure dans la leucémogénèse.

Les voies moléculaires de la leucémogénèse des fusions *NUP98* passent pour la majorité d'entre elles par la surexpression des gènes *HOX* du cluster A. Dans le cas des fusions *NUP98-gènes à homéoboites* qui constituent 46% des gènes partenaires de *NUP98* (groupe 1 des gènes partenaires), les modèles animaux montrent qu'elles entrainent des transformations lentes, nécessitant pour l'entrée en leucémie aiguë, un deuxième évènement génétique, qui est le plus souvent une surexpression de l'oncogène *MEIS1*. Dans le cas des fusions *NUP98*-gènes intervenant dans le contrôle de la conformation de la chromatine (21% des gènes fusionnés à *NUP98*), en dehors de la fusion *NUP98-MLL*, les fusions modélisées montrent également le rôle important de la dérégulation des gènes *HOX* dans la transformation cellulaire. Mais à la différence des fusions *NUP98-homéogène*, elles ciblent, du fait de leur fonction, d'autres gènes, dont *MEIS1*. De ce fait, ces fusions dérégulant les *HOX* et *MEIS1* sont des modèles à transformation rapide. Ces résultats rapprochent ces fusions *NUP98,* des fusions *MLL* qui ciblent également la voie des *HOX*.

Nos travaux montrent que d'autres voies moléculaires peuvent également être recrutées par ces fusions pour la transformation des cellules. La fusion *NUP98-HMGB3* peut se situer en aval de la voie *HOX* et *MEIS1*, mais nous n'avons aucune information sur les voies empruntées par la leucémogénèse *NUP98-CCDC28A*. De même, l'étude des fusions *NUP98-gènes cytoplasmiques* sera d'une grande utilité pour mieux appréhender de nouveaux mécanismes liés aux fusions *NUP98*.

Il est important à ce propos de citer les récents travaux de (Takeda et al., 2010), publiés en mars de cette année, qui démontrent que les fusions *NUP98* sont également caractérisées par des dysfonctionnements du trafic nucléoplasmique des protéines. Ces auteurs démontrent en effet, à partir d'expériences de cotransfection, dans des cellules de la lignée K562, de *NUP98-HOXA9* ainsi que de *NUP98-DDX10,* que les domaines FG de ces protéines

chimériques fixent l'exportine CRM1 (chromosome region maintenance 1), malgré l'absence de signaux d'exportation nucléaire, normalement nécessaire pour la fixation des protéines cargo à cette exportine. Ces auteurs ont démontré que cette fixation à CRM1 entrainait la rétention de CRM1, ainsi que celle de NFAT et NFκB, protéines se fixant sur CRM1 pour leur exportation vers cytoplasme. Cette rétention entraine ainsi une augmentation de leur activité transcriptionnelle, pouvant être un événement oncogénique coopératif.
On peut donc supposer que les fusions NUP98 avec des protéines qui ont perdu leur domaine de localisation nucléaire ou leur domaine d'exportation nucléaire (ce qui est le cas pour les fusions *NUP98-Topoisimérases*), ou avec les protéines cytoplasmiques, doivent perturber considérablement le trafic nucléo-cytoplasmique.

Ainsi, les protéines NUP98 agissent-elles comme des molécules, qui :

- par leur partie NUP98 interviennent
    - d'une part dans l'ouverture de la chromatine (acétylation par la fixation de CBP/P300) des loci ciblées par certaines protéines partenaires (HOX et gènes partenaire de type 2 et 3)
    - d'autre part dans la rétention nucléaire de facteurs de transcription augmentant par là leur activité transcriptionnelle
- par les protéines partenaires ciblent des facteurs de la différenciation des cellules hématopoïétiques, comme les HOX, dont ils dérégulent l'expression.

F. Perspectives

Bien que rare, les fusions *NUP98* sont des fenêtres sur des mécanismes moléculaires oncogéniques, dont certains sont connus (voie HOX), et d'autres sont nouveaux.

Les fusions *NUP98-HMGB3* et *NUP98-CCDC28A* sont des oncogènes puissants (transformation rapide) dont la modélisation devrait nous permettre d'appréhender d'autres voies que celles des HOX. Une étude du transcriptome des cellules murines blastiques cKit^{+} de ces fusions pourrait mettre en évidence des nouveaux gènes cibles dérégulés, potentiellement impliqués dans des mécanismes de survie, de prolifération ou de différenciation. L'étude du protéome de NUP98-CCDC28A et de CCDC28A déboucherait sur une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de cette fusion, ainsi que le rôle physiologique de ce nouveau partenaire de *NUP98*.

Les remaniements du gène *NUP98* dans les hémopathies malignes semblent associés à un pronostic défavorable, malgré l'utilisation des polychimiothérapies intensives actuelles. L'identification de cibles nouvelles pourrait permettre l'optimisation des traitements, par l'utilisation de thérapeutique « à la carte », ciblant l'altération des voies de signalisation particulièrement importantes, dans le maintien et la résistance des cellules leucémiques aux traitements conventionnels.

V. REFERENCES

Abramovich, C. and Humphries, R.K. (2005) Hox regulation of normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*, **12**, 210-216.

Ageberg, M., Drott, K., Olofsson, T., Gullberg, U. and Lindmark, A. (2008) Identification of a novel and myeloid specific role of the leukemia-associated fusion protein DEK-NUP214 leading to increased protein synthesis. *Genes Chromosomes Cancer*, **47**, 276-287.

Ahuja, H.G., Felix, C.A. and Aplan, P.D. (1999) The t(11;20)(p15;q11) chromosomal translocation associated with therapy-related myelodysplastic syndrome results in an NUP98-TOP1 fusion. *Blood*, **94**, 3258-3261.

Ahuja, H.G., Felix, C.A. and Aplan, P.D. (2000a) Potential role for DNA topoisomerase II poisons in the generation of t(11;20)(p15;q11) translocations. *Genes Chromosomes Cancer*, **29**, 96-105.

Ahuja, H.G., Hong, J., Aplan, P.D., Tcheurekdjian, L., Forman, S.J. and Slovak, M.L. (2000b) t(9;11)(p22;p15) in acute myeloid leukemia results in a fusion between NUP98 and the gene encoding transcriptional coactivators p52 and p75-lens epithelium-derived growth factor (LEDGF). *Cancer Res*, **60**, 6227-6229.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman, I.L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, **404**, 193-197.

Arai, Y., Hosoda, F., Kobayashi, H., Arai, K., Hayashi, Y., Kamada, N., Kaneko, Y. and Ohki, M. (1997) The inv(11)(p15q22) chromosome translocation of de novo and therapy-related myeloid malignancies results in fusion of the nucleoporin gene, NUP98, with the putative RNA helicase gene, DDX10. *Blood*, **89**, 3936-3944.

Arai, Y., Kyo, T., Miwa, H., Arai, K., Kamada, N., Kita, K. and Ohki, M. (2000) Heterogenous fusion transcripts involving the NUP98 gene and HOXD13 gene activation in a case of acute myeloid leukemia with the t(2;11)(q31;p15) translocation. *Leukemia*, **14**, 1621-1629.

Argiropoulos, B. and Humphries, R.K. (2007) Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene*, **26**, 6766-6776.

Armstrong, S.A., Staunton, J.E., Silverman, L.B., Pieters, R., den Boer, M.L., Minden, M.D., Sallan, S.E., Lander, E.S., Golub, T.R. and Korsmeyer, S.J. (2002) MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*, **30**, 41-47.

Ayton, P.M. and Cleary, M.L. (2003) Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev*, **17**, 2298-2307.

Bacher, U., Haferlach, T., Schoch, C., Kern, W. and Schnittger, S. (2006) Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*, **107**, 3847-3853.

Badano, J.L., Leitch, C.C., Ansley, S.J., May-Simera, H., Lawson, S., Lewis, R.A., Beales, P.L., Dietz, H.C., Fisher, S. and Katsanis, N. (2006) Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature*, **439**, 326-330.

Badenhorst, P., Voas, M., Rebay, I. and Wu, C. (2002) Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev*, **16**, 3186-3198.

Baker, D.J., Dawlaty, M.M., Galardy, P. and van Deursen, J.M. (2007) Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 589-600.

Barak, O., Lazzaro, M.A., Lane, W.S., Speicher, D.W., Picketts, D.J. and Shiekhattar, R. (2003) Isolation of human NURF: a regulator of Engrailed gene expression. *Embo J*, **22**, 6089-6100.

Beachy, P.A., Karhadkar, S.S. and Berman, D.M. (2004) Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, **432**, 324-331.

Bene, M.C., Bernier, M., Casasnovas, R.O., Castoldi, G., Knapp, W., Lanza, F., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., Sperling, C. and van't Veer, M.B. (1998) The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood*, **92**, 596-599.

Bene, M.C., Bernier, M., Castoldi, G., Faure, G.C., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A. and van't Veer, M. (1999) Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. *Haematologica*, **84**, 1024-1034.

Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A. and van't Veer, M.B. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, **9**, 1783-1786.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. and Sultan, C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, **33**, 451-458.

Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W., Regev, A. and Weinberg, R.A. (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*, **40**, 499-507.

Bijl, J., Thompson, A., Ramirez-Solis, R., Krosl, J., Grier, D.G., Lawrence, H.J. and Sauvageau, G. (2006) Analysis of HSC activity and compensatory Hox gene expression profile in Hoxb cluster mutant fetal liver cells. *Blood*, **108**, 116-122.

Blair, A., Hogge, D.E. and Sutherland, H.J. (1998) Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR. *Blood*, **92**, 4325-4335.

Bohlander, S.K. (2005) ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*, **15**, 162-174.

Bonnet, D. and Dick, J.E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, **3**, 730-737.

Borrow, J., Shearman, A.M., Stanton, V.P., Jr., Becher, R., Collins, T., Williams, A.J., Dube, I., Katz, F., Kwong, Y.L., Morris, C., Ohyashiki, K., Toyama, K., Rowley, J. and Housman, D.E. (1996) The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet*, **12**, 159-167.

Bowen, D.T., Frew, M.E., Hills, R., Gale, R.E., Wheatley, K., Groves, M.J., Langabeer, S.E., Kottaridis, P.D., Moorman, A.V., Burnett, A.K. and Linch, D.C. (2005) RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*, **106**, 2113-2119.

Brown, C.R. and Silver, P.A. (2007) Transcriptional regulation at the nuclear pore complex. *Curr Opin Genet Dev*, **17**, 100-106.

Brown, J., Jawad, M., Twigg, S.R., Saracoglu, K., Sauerbrey, A., Thomas, A.E., Eils, R., Harbott, J. and Kearney, L. (2002) A cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in 2 children with acute myeloid leukemia with apparently normal karyotypes, identified by a multiplex fluorescence in situ hybridization telomere assay. *Blood*, **99**, 2526-2531.

Calvo, K.R., Sykes, D.B., Pasillas, M.P. and Kamps, M.P. (2002) Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene*, **21**, 4247-4256.

Casolari, J.M., Brown, C.R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H. and Silver, P.A. (2004) Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell*, **117**, 427-439.

Cellot, S., Krosl, J., Chagraoui, J., Meloche, S., Humphries, R.K. and Sauvageau, G. (2007) Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in Hoxb4hiPbx1(10) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, **35**, 802-816.

Cerveira, N., Correia, C., Doria, S., Bizarro, S., Rocha, P., Gomes, P., Torres, L., Norton, L., Borges, B.S., Castedo, S. and Teixeira, M.R. (2003) Frequency of NUP98-NSD1 fusion transcript in childhood acute myeloid leukaemia. *Leukemia*, **17**, 2244-2247.

Chalandon, Y. and Schwaller, J. (2005) Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies. *Haematologica*, **90**, 949-968.

Chaligne, R., James, C., Tonetti, C., Besancenot, R., Le Couedic, J.P., Fava, F., Mazurier, F., Godin, I., Maloum, K., Larbret, F., Lecluse, Y., Vainchenker, W. and Giraudier, S. (2007) Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood*, **110**, 3735-3743.

Chao, M.P., Seita, J. and Weissman, I.L. (2008) Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **73**, 439-449.

Chaplin, T., Ayton, P., Bernard, O.A., Saha, V., Della Valle, V., Hillion, J., Gregorini, A., Lillington, D., Berger, R. and Young, B.D. (1995) A novel class of zinc finger/leucine zipper genes identified from the molecular cloning of the t(10;11) translocation in acute leukemia. *Blood*, **85**, 1435-1441.

Chen, C.C., Yang, C.F., Lee, K.D., You, J.Y., Yu, Y.B., Ho, C.H., Tzeng, C.H., Chau, W.K., Hsu, H.C. and Gau, J.P. (2007) Complex karyotypes confer a poor survival in adult acute myeloid leukemia with unfavorable cytogenetic abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet*, **174**, 138-146.

Chen, S., Xue, Y., Chen, Z., Guo, Y., Wu, Y. and Pan, J. (2003) Generation of the NUP98-TOP1 fusion transcript by the t(11;20) (p15;q11) in a case of acute monocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, **140**, 153-156.

Chen, W., Li, Q., Hudson, W.A., Kumar, A., Kirchhof, N. and Kersey, J.H. (2006) A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood*, **108**, 669-677.

Cheung, N., Chan, L.C., Thompson, A., Cleary, M.L. and So, C.W. (2007) Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nat Cell Biol*, **9**, 1208-1215.

Chou, W.C., Chen, C.Y., Hou, H.A., Lin, L.I., Tang, J.L., Yao, M., Tsay, W., Ko, B.S., Wu, S.J., Huang, S.Y., Hsu, S.C., Chen, Y.C., Huang, Y.N., Tseng, M.H., Huang, C.F. and Tien, H.F. (2009) Acute myeloid leukemia bearing t(7;11)(p15;p15) is a distinct cytogenetic entity with poor outcome and a distinct mutation profile: comparative analysis of 493 adult patients. *Leukemia*.

Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K.H., Salcini, A.E. and Helin, K. (2007) RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri-and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell*, **128**, 1063-1076.

Cimino, G., Sprovieri, T., Rapanotti, M.C., Foa, R., Mecucci, C. and Mandelli, F. (2001) Molecular evaluation of the NUP98/RAP1GDS1 gene frequency in adults with T-acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **86**, 436-437.

Clarke, M.F. and Fuller, M. (2006) Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, **124**, 1111-1115.

Clarkson, B., Strife, A., Wisniewski, D., Lambek, C.L. and Liu, C. (2003) Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*, **17**, 1211-1262.

Clavel, J., Goubin, A., Auclerc, M.F., Auvrignon, A., Waterkeyn, C., Patte, C., Baruchel, A., Leverger, G., Nelken, B., Philippe, N., Sommelet, D., Vilmer, E., Bellec, S., Perrillat-Menegaux, F. and Hemon, D. (2004) Incidence of childhood leukaemia and non-

Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990-1999. *Eur J Cancer Prev*, **13**, 97-103.

Cozzio, A., Passegue, E., Ayton, P.M., Karsunky, H., Cleary, M.L. and Weissman, I.L. (2003) Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev*, **17**, 3029-3035.

Dash, A.B., Williams, I.R., Kutok, J.L., Tomasson, M.H., Anastasiadou, E., Lindahl, K., Li, S., Van Etten, R.A., Borrow, J., Housman, D., Druker, B. and Gilliland, D.G. (2002) A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7622-7627.

Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Masse, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.P., Robert, F., Alberdi, A., Lecluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F.J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S.P., Dessen, P., Soulier, J., Viguie, F., Fontenay, M., Vainchenker, W. and Bernard, O.A. (2009) Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*, **360**, 2289-2301.

den Besten, W., Kuo, M.L., Williams, R.T. and Sherr, C.J. (2005) Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle*, **4**, 1593-1598.

DiMartino, J.F., Selleri, L., Traver, D., Firpo, M.T., Rhee, J., Warnke, R., O'Gorman, S., Weissman, I.L. and Cleary, M.L. (2001) The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver. *Blood*, **98**, 618-626.

Dobson, C.L., Warren, A.J., Pannell, R., Forster, A. and Rabbitts, T.H. (2000) Tumorigenesis in mice with a fusion of the leukaemia oncogene Mll and the bacterial lacZ gene. *Embo J*, **19**, 843-851.

Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M. and Rout, M.P. (2002) Cleave to leave: structural insights into the dynamic organization of the nuclear pore complex. *Mol Cell*, **10**, 221-223.

Dorrance, A.M., Liu, S., Yuan, W., Becknell, B., Arnoczky, K.J., Guimond, M., Strout, M.P., Feng, L., Nakamura, T., Yu, L., Rush, L.J., Weinstein, M., Leone, G., Wu, L., Ferketich, A., Whitman, S.P., Marcucci, G. and Caligiuri, M.A. (2006) Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. *J Clin Invest*, **116**, 2707-2716.

Eisenmann, K.M., Dykema, K.J., Matheson, S.F., Kent, N.F., Deward, A.D., West, R.A., Tibes, R., Furge, K.A. and Alberts, A.S. (2009) 5q- myelodysplastic syndromes: chromosome 5q genes direct a tumor-suppression network sensing actin dynamics. *Oncogene*.

Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D. and Sklar, J. (1991) TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, **66**, 649-661.

Ellisen, L.W., Carlesso, N., Cheng, T., Scadden, D.T. and Haber, D.A. (2001) The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Embo J*, **20**, 1897-1909.

Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R. and Kantarjian, H.M. (1999) The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **341**, 164-172.

Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., Bigerna, B., Pacini, R., Pucciarini, A., Liso, A., Vignetti, M., Fazi, P., Meani, N., Pettirossi, V., Saglio, G., Mandelli, F., Lo-Coco, F., Pelicci, P.G. and Martelli, M.F. (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, **352**, 254-266.

Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. and Parkin, D.M. (2004) GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARCPress, Lyon.

Ferrando, A.A., Armstrong, S.A., Neuberg, D.S., Sallan, S.E., Silverman, L.B., Korsmeyer, S.J. and Look, A.T. (2003) Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood*, **102**, 262-268.

Fontoura, B.M., Dales, S., Blobel, G. and Zhong, H. (2001) The nucleoporin Nup98 associates with the intranuclear filamentous protein network of TPR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3208-3213.

Frohling, S., Scholl, C., Levine, R.L., Loriaux, M., Boggon, T.J., Bernard, O.A., Berger, R., Dohner, H., Dohner, K., Ebert, B.L., Teckie, S., Golub, T.R., Jiang, J., Schittenhelm, M.M., Lee, B.H., Griffin, J.D., Stone, R.M., Heinrich, M.C., Deininger, M.W., Druker, B.J. and Gilliland, D.G. (2007) Identification of driver and passenger mutations of FLT3 by high-throughput DNA sequence analysis and functional assessment of candidate alleles. *Cancer Cell*, **12**, 501-513.

Fujino, T., Suzuki, A., Ito, Y., Ohyashiki, K., Hatano, Y., Miura, I. and Nakamura, T. (2002) Single-translocation and double-chimeric transcripts: detection of NUP98-HOXA9 in myeloid leukemias with HOXA11 or HOXA13 breaks of the chromosomal translocation t(7;11)(p15;p15). *Blood*, **99**, 1428-1433.

Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C. and Orkin, S.H. (1996) Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12355-12358.

Gal, H., Amariglio, N., Trakhtenbrot, L., Jacob-Hirsh, J., Margalit, O., Avigdor, A., Nagler, A., Tavor, S., Ein-Dor, L., Lapidot, T., Domany, E., Rechavi, G. and Givol, D. (2006) Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells. *Leukemia*, **20**, 2147-2154.

George, A.A., Franklin, J., Kerkof, K., Shah, A.J., Price, M., Tsark, E., Bockstoce, D., Yao, D., Hart, N., Carcich, S., Parkman, R., Crooks, G.M. and Weinberg, K. (2001) Detection of leukemic cells in the CD34(+)CD38(-) bone marrow progenitor population in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **97**, 3925-3930.

Gervais, C., Mauvieux, L., Perrusson, N., Helias, C., Struski, S., Leymarie, V., Lioure, B. and Lessard, M. (2005) A new translocation t(9;11)(q34;p15) fuses NUP98 to a novel homeobox partner gene, PRRX2, in a therapy-related acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **19**, 145-148.

Ghannam, G., Takeda, A., Camarata, T., Moore, M.A., Viale, A. and Yaseen, N.R. (2004) The oncogene Nup98-HOXA9 induces gene transcription in myeloid cells. *J Biol Chem*, **279**, 866-875.

Gorello, P., Brandimarte, L., La Starza, R., Pierini, V., Bury, L., Rosati, R., Martelli, M.F., Vandenberghe, P., Wlodarska, I. and Mecucci, C. (2008) t(3;11)(q12;p15)/NUP98-LOC348801 fusion transcript in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **93**, 1398-1401.

Goubin, A., Auclerc, M.F., Auvrignon, A., Patte, C., Bergeron, C., Hemon, D. and Clavel, J. (2006) Survival in France after childhood acute leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma (1990-2000). *Eur J Cancer*, **42**, 534-541.

Grabher, C., von Boehmer, H. and Look, A.T. (2006) Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*, **6**, 347-359.

Graux, C., Cools, J., Melotte, C., Quentmeier, H., Ferrando, A., Levine, R., Vermeesch, J.R., Stul, M., Dutta, B., Boeckx, N., Bosly, A., Heimann, P., Uyttebroeck, A., Mentens, N., Somers, R., MacLeod, R.A., Drexler, H.G., Look, A.T., Gilliland, D.G., Michaux, L., Vandenberghe, P., Wlodarska, I., Marynen, P. and Hagemeijer, A. (2004) Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, **36**, 1084-1089.

Griffis, E.R., Altan, N., Lippincott-Schwartz, J. and Powers, M.A. (2002) Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics. *Mol Biol Cell*, **13**, 1282-1297.

Griffis, E.R., Xu, S. and Powers, M.A. (2003) Nup98 localizes to both nuclear and cytoplasmic sides of the nuclear pore and binds to two distinct nucleoporin subcomplexes. *Mol Biol Cell*, **14**, 600-610.

Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B. and Pandolfi, P.P. (2006) Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 493-505.

Grisolano, J.L., O'Neal, J., Cain, J. and Tomasson, M.H. (2003) An activated receptor tyrosine kinase, TEL/PDGFbetaR, cooperates with AML1/ETO to induce acute myeloid leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9506-9511.

Gu, B.W., Wang, Q., Wang, J.M., Xue, Y.Q., Fang, J., Wong, K.F., Chen, B., Shi, Z.Z., Shi, J.Y., Bai, X.T., Wu, D.H., Chen, Z. and Chen, S.J. (2003) Major form of NUP98/HOXC11 fusion in adult AML with t(11;12)(p15;q13) translocation exhibits aberrant trans-regulatory activity. *Leukemia*, **17**, 1858-1864.

Guenther, M.G., Jenner, R.G., Chevalier, B., Nakamura, T., Croce, C.M., Canaani, E. and Young, R.A. (2005) Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8603-8608.

Haferlach, T. (2008) Molecular genetic pathways as therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 400-411.

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

Harper, D.P. and Aplan, P.D. (2008) Chromosomal rearrangements leading to MLL gene fusions: clinical and biological aspects. *Cancer Res*, **68**, 10024-10027.

Hasle, H., Alonzo, T.A., Auvrignon, A., Behar, C., Chang, M., Creutzig, U., Fischer, A., Forestier, E., Fynn, A., Haas, O.A., Harbott, J., Harrison, C.J., Heerema, N.A., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Kaspers, G.J., Locatelli, F., Noellke, P., Polychronopoulou, S., Ravindranath, Y., Razzouk, B., Reinhardt, D., Savva, N.N., Stark, B., Suciu, S., Tsukimoto, I., Webb, D.K., Wojcik, D., Woods, W.G., Zimmermann, M., Niemeyer, C.M. and Raimondi, S.C. (2007) Monosomy 7 and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study. *Blood*, **109**, 4641-4647.

Hess, J.L. (2004) MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med*, **10**, 500-507.

Hess, J.L., Yu, B.D., Li, B., Hanson, R. and Korsmeyer, S.J. (1997) Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood*, **90**, 1799-1806.

Hidaka, E., Tanaka, M., Matsuda, K., Ishikawa-Matsumura, M., Yamauchi, K., Sano, K., Honda, T., Wakui, K., Yanagisawa, R., Nakazawa, Y., Sakashita, K., Shiohara, M., Ishii, E. and Koike, K. (2007) A complex karyotype, including a three-way translocation generating a NUP98-HOXD13 transcript, in an infant with acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, **176**, 137-143.

Hirose, K., Abramovich, C., Argiropoulos, B. and Humphries, R.K. (2008) Leukemogenic properties of NUP98-PMX1 are linked to NUP98 and homeodomain sequence functions but not to binding properties of PMX1 to serum response factor. *Oncogene*, **27**, 6056-6067.

Hisa, T., Spence, S.E., Rachel, R.A., Fujita, M., Nakamura, T., Ward, J.M., Devor-Henneman, D.E., Saiki, Y., Kutsuna, H., Tessarollo, L., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (2004) Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *Embo J*, **23**, 450-459.

Ho, P.A., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., Pollard, J., Stirewalt, D.L., Hurwitz, C., Heerema, N.A., Hirsch, B., Raimondi, S.C., Lange, B., Franklin, J.L., Radich, J.P. and

Meshinchi, S. (2009) Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group. *Blood*, **113**, 6558-6566.

Hodel, A.E., Hodel, M.R., Griffis, E.R., Hennig, K.A., Ratner, G.A., Xu, S. and Powers, M.A. (2002) The three-dimensional structure of the autoproteolytic, nuclear pore-targeting domain of the human nucleoporin Nup98. *Mol Cell*, **10**, 347-358.

Hoischen, A., van Bon, B.W., Gilissen, C., Arts, P., van Lier, B., Steehouwer, M., de Vries, P., de Reuver, R., Wieskamp, N., Mortier, G., Devriendt, K., Amorim, M.Z., Revencu, N., Kidd, A., Barbosa, M., Turner, A., Smith, J., Oley, C., Henderson, A., Hayes, I.M., Thompson, E.M., Brunner, H.G., de Vries, B.B. and Veltman, J.A. (2010) De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat Genet*, **42**, 483-485.

Hong, D., Gupta, R., Ancliff, P., Atzberger, A., Brown, J., Soneji, S., Green, J., Colman, S., Piacibello, W., Buckle, V., Tsuzuki, S., Greaves, M. and Enver, T. (2008) Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science*, **319**, 336-339.

Hope, K.J., Jin, L. and Dick, J.E. (2004) Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*, **5**, 738-743.

Huntly, B.J., Shigematsu, H., Deguchi, K., Lee, B.H., Mizuno, S., Duclos, N., Rowan, R., Amaral, S., Curley, D., Williams, I.R., Akashi, K. and Gilliland, D.G. (2004) MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell*, **6**, 587-596.

Hussey, D.J., Moore, S., Nicola, M. and Dobrovic, A. (2001) Fusion of the NUP98 gene with the LEDGF/p52 gene defines a recurrent acute myeloid leukemia translocation. *BMC Genet*, **2**, 20.

Hussey, D.J., Nicola, M., Moore, S., Peters, G.B. and Dobrovic, A. (1999) The (4;11)(q21;p15) translocation fuses the NUP98 and RAP1GDS1 genes and is recurrent in T-cell acute lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**, 2072-2079.

Ikegami, K. and Lieb, J.D. (2010) Nucleoporins and transcription: new connections, new questions. *PLoS Genet*, **6**, e1000861.

Ishikawa, M., Yagasaki, F., Okamura, D., Maeda, T., Sugahara, Y., Jinnai, I. and Bessho, M. (2007) A novel gene, ANKRD28 on 3p25, is fused with NUP98 on 11p15 in a cryptic 3-way translocation of t(3;5;11)(p25;q35;p15) in an adult patient with myelodysplastic syndrome/acute myelogenous leukemia. *Int J Hematol*, **86**, 238-245.

Ishikawa, Y., Kiyoi, H., Tsujimura, A., Miyawaki, S., Miyazaki, Y., Kuriyama, K., Tomonaga, M. and Naoe, T. (2009) Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*.

Iwase, S., Akiyama, N., Sekikawa, T., Saito, S., Arakawa, Y., Horiguchi-Yamada, J. and Yamada, H. (2003) Both NUP98/TOP1 and TOP1/NUP98 transcripts are detected in a de novo AML with t(11;20)(p15;q11). *Genes Chromosomes Cancer*, **38**, 102-105.

Jaju, R.J., Fidler, C., Haas, O.A., Strickson, A.J., Watkins, F., Clark, K., Cross, N.C., Cheng, J.F., Aplan, P.D., Kearney, L., Boultwood, J. and Wainscoat, J.S. (2001) A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia. *Blood*, **98**, 1264-1267.

Jamieson, C.H., Ailles, L.E., Dylla, S.J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J.L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M.G., Keating, A., Sawyers, C.L. and Weissman, I.L. (2004a) Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*, **351**, 657-667.

Jamieson, C.H., Weissman, I.L. and Passegue, E. (2004b) Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of self-renewal. *Cancer Cell*, **6**, 531-533.

Jankovic, D., Gorello, P., Liu, T., Ehret, S., La Starza, R., Desjobert, C., Baty, F., Brutsche, M., Jayaraman, P.S., Santoro, A., Mecucci, C. and Schwaller, J. (2008) Leukemogenic mechanisms and targets of a NUP98/HHEX fusion in acute myeloid leukemia. *Blood*, **111**, 5672-5682.

Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G., Michels, E., Mosseri, V., Ribeiro, A., Lequin, D., Vermeulen, J., Couturier, J., Peuchmaur, M., Valent, A., Plantaz, D., Rubie, H., Valteau-Couanet, D., Thomas, C., Combaret, V., Rousseau, R., Eggert, A., Michon, J., Speleman, F. and Delattre, O. (2009) Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol*, **27**, 1026-1033.

Jansen, M.W., Corral, L., van der Velden, V.H., Panzer-Grumayer, R., Schrappe, M., Schrauder, A., Marschalek, R., Meyer, C., den Boer, M.L., Hop, W.J., Valsecchi, M.G., Basso, G., Biondi, A., Pieters, R. and van Dongen, J.J. (2007) Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. *Leukemia*, **21**, 633-641.

Jeganathan, K.B., Baker, D.J. and van Deursen, J.M. (2006) Securin associates with APCCdh1 in prometaphase but its destruction is delayed by Rae1 and Nup98 until the metaphase/anaphase transition. *Cell Cycle*, **5**, 366-370.

Jeganathan, K.B., Malureanu, L. and van Deursen, J.M. (2005) The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature*, **438**, 1036-1039.

Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R. and Reuter, G. (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 80-93.

Kaltenbach, S., Soler, G., Barin, C., Gervais, C., Bernard, O.A., Penard-Lacronique, V. and Romana, S.P. (2010) A NUP98-MLL fusion in human acute myeloblastic leukemia. *Blood*.

Kasper, L.H., Brindle, P.K., Schnabel, C.A., Pritchard, C.E., Cleary, M.L. and van Deursen, J.M. (1999) CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Mol Cell Biol*, **19**, 764-776.

Kelly, L.M., Kutok, J.L., Williams, I.R., Boulton, C.L., Amaral, S.M., Curley, D.P., Ley, T.J. and Gilliland, D.G. (2002) PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8283-8288.

King-Underwood, L. and Pritchard-Jones, K. (1998) Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood*, **91**, 2961-2968.

Klose, R.J., Yan, Q., Tothova, Z., Yamane, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Gilliland, D.G., Zhang, Y. and Kaelin, W.G., Jr. (2007) The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. *Cell*, **128**, 889-900.

Kogan, S.C., Ward, J.M., Anver, M.R., Berman, J.J., Brayton, C., Cardiff, R.D., Carter, J.S., de Coronado, S., Downing, J.R., Fredrickson, T.N., Haines, D.C., Harris, A.W., Harris, N.L., Hiai, H., Jaffe, E.S., MacLennan, I.C., Pandolfi, P.P., Pattengale, P.K., Perkins, A.S., Simpson, R.M., Tuttle, M.S., Wong, J.F. and Morse, H.C., 3rd. (2002) Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood*, **100**, 238-245.

Krivtsov, A.V. and Armstrong, S.A. (2007) MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*, **7**, 823-833.

Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., Golub, T.R. and Armstrong, S.A. (2006)

Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*, **442**, 818-822.

Kroon, E., Krosl, J., Thorsteinsdottir, U., Baban, S., Buchberg, A.M. and Sauvageau, G. (1998) Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *Embo J*, **17**, 3714-3725.

Kroon, E., Thorsteinsdottir, U., Mayotte, N., Nakamura, T. and Sauvageau, G. (2001) NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *Embo J*, **20**, 350-361.

Kumar, A.R., Li, Q., Hudson, W.A., Chen, W., Sam, T., Yao, Q., Lund, E.A., Wu, B., Kowal, B.J. and Kersey, J.H. (2009) A role for MEIS1 in MLL-fusion gene leukemia. *Blood*, **113**, 1756-1758.

Kwong, Y.L. and Pang, A. (1999) Low frequency of rearrangements of the homeobox gene HOXA9/t(7;11) in adult acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **25**, 70-74.

La Starza, R., Brandimarte, L., Pierini, V., Nofrini, V., Gorello, P., Crescenzi, B., Berchicci, L., Matteucci, C., Romoli, S., Beacci, D., Rosati, R., Martelli, M.F. and Mecucci, C. (2009) A NUP98-positive acute myeloid leukemia with a t(11;12)(p15;q13) without HOXC cluster gene involvement. *Cancer Genet Cytogenet*, **193**, 109-111.

La Starza, R., Trubia, M., Crescenzi, B., Matteucci, C., Negrini, M., Martelli, M.F., Pelicci, P.G. and Mecucci, C. (2003) Human homeobox gene HOXC13 is the partner of NUP98 in adult acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer*, **36**, 420-423.

Lahortiga, I., Vizmanos, J.L., Agirre, X., Vazquez, I., Cigudosa, J.C., Larrayoz, M.J., Sala, F., Gorosquieta, A., Perez-Equiza, K., Calasanz, M.J. and Odero, M.D. (2003) NUP98 is fused to adducin 3 in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia and myeloid markers, with a new translocation t(10;11)(q25;p15). *Cancer Res*, **63**, 3079-3083.

Lam, D.H. and Aplan, P.D. (2001) NUP98 gene fusions in hematologic malignancies. *Leukemia*, **15**, 1689-1695.

Lane, S.W., Scadden, D.T. and Gilliland, D.G. (2009) The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood*, **114**, 1150-1157.

Lemons, D. and McGinnis, W. (2006) Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science*, **313**, 1918-1922.

Lessard, J. and Sauvageau, G. (2003a) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, **423**, 255-260.

Lessard, J. and Sauvageau, G. (2003b) Polycomb group genes as epigenetic regulators of normal and leukemic hemopoiesis. *Exp Hematol*, **31**, 567-585.

Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J.C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Frohling, S., Dohner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R.A., Tefferi, A., Griffin, J.D., Eck, M.J., Sellers, W.R., Meyerson, M., Golub, T.R., Lee, S.J. and Gilliland, D.G. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, **7**, 387-397.

Levis, M. and Small, D. (2003) FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia*, **17**, 1738-1752.

Ley, T.J., Mardis, E.R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M.D., Chen, K., Dooling, D., Dunford-Shore, B.H., McGrath, S., Hickenbotham, M., Cook, L., Abbott, R., Larson, D.E., Koboldt, D.C., Pohl, C., Smith, S., Hawkins, A., Abbott, S., Locke, D., Hillier, L.W., Miner, T., Fulton, L., Magrini, V., Wylie, T., Glasscock, J., Conyers, J., Sander, N., Shi, X., Osborne, J.R., Minx, P., Gordon, D., Chinwalla, A., Zhao, Y., Ries, R.E., Payton, J.E., Westervelt, P., Tomasson, M.H., Watson, M., Baty, J., Ivanovich, J.,

Heath, S., Shannon, W.D., Nagarajan, R., Walter, M.J., Link, D.C., Graubert, T.A., DiPersio, J.F. and Wilson, R.K. (2008) DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*, **456**, 66-72.

Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D. and Patel, D.J. (2006) Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*, **442**, 91-95.

Liedtke, M. and Cleary, M.L. (2009) Therapeutic targeting of MLL. *Blood*, **113**, 6061-6068.

Little, M. and Wells, C. (1997) A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat*, **9**, 209-225.

Liu, H., Cheng, E.H. and Hsieh, J.J. (2007) Bimodal degradation of MLL by SCFSkp2 and APCCdc20 assures cell cycle execution: a critical regulatory circuit lost in leukemogenic MLL fusions. *Genes Dev*, **21**, 2385-2398.

Liu, H., Cheng, E.H. and Hsieh, J.J. (2009) MLL fusions: Pathways to leukemia. *Cancer Biol Ther*, **8**.

Malinge, S., Ben-Abdelali, R., Settegrana, C., Radford-Weiss, I., Debre, M., Beldjord, K., Macintyre, E.A., Villeval, J.L., Vainchenker, W., Berger, R., Bernard, O.A., Delabesse, E. and Penard-Lacronique, V. (2007) Novel activating JAK2 mutation in a patient with Down syndrome and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **109**, 2202-2204.

Mayotte, N., Roy, D.C., Yao, J., Kroon, E. and Sauvageau, G. (2002) Oncogenic interaction between BCR-ABL and NUP98-HOXA9 demonstrated by the use of an in vitro purging culture system. *Blood*, **100**, 4177-4184.

McDevitt, M.A., Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., Yang, H. and Orkin, S.H. (1997) A "knockdown" mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6781-6785.

Meyer, C., Kowarz, E., Hofmann, J., Renneville, A., Zuna, J., Trka, J., Ben Abdelali, R., Macintyre, E., De Braekeleer, E., De Braekeleer, M., Delabesse, E., de Oliveira, M.P., Cave, H., Clappier, E., van Dongen, J.J., Balgobind, B.V., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Beverloo, H.B., Panzer-Grumayer, R., Teigler-Schlegel, A., Harbott, J., Kjeldsen, E., Schnittger, S., Koehl, U., Gruhn, B., Heidenreich, O., Chan, L.C., Yip, S.F., Krzywinski, M., Eckert, C., Moricke, A., Schrappe, M., Alonso, C.N., Schafer, B.W., Krauter, J., Lee, D.A., Zur Stadt, U., Te Kronnie, G., Sutton, R., Izraeli, S., Trakhtenbrot, L., Lo Nigro, L., Tsaur, G., Fechina, L., Szczepanski, T., Strehl, S., Ilencikova, D., Molkentin, M., Burmeister, T., Dingermann, T., Klingebiel, T. and Marschalek, R. (2009) New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*, **23**, 1490-1499.

Milne, T.A., Hughes, C.M., Lloyd, R., Yang, Z., Rozenblatt-Rosen, O., Dou, Y., Schnepp, R.W., Krankel, C., Livolsi, V.A., Gibbs, D., Hua, X., Roeder, R.G., Meyerson, M. and Hess, J.L. (2005a) Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 749-754.

Milne, T.A., Martin, M.E., Brock, H.W., Slany, R.K. and Hess, J.L. (2005b) Leukemogenic MLL fusion proteins bind across a broad region of the Hox a9 locus, promoting transcription and multiple histone modifications. *Cancer Res*, **65**, 11367-11374.

Mitelman, F., Johansson, B. and Mertens, F. (2007) The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*, **7**, 233-245.

Moens, C.B. and Selleri, L. (2006) Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol*, **291**, 193-206.

Moorman, A.V., Richards, S.M., Robinson, H.M., Strefford, J.C., Gibson, B.E., Kinsey, S.E., Eden, T.O., Vora, A.J., Mitchell, C.D. and Harrison, C.J. (2007) Prognosis of children

with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood*, **109**, 2327-2330.

Morerio, C., Acquila, M., Rapella, A., Tassano, E., Rosanda, C. and Panarello, C. (2006) Inversion (11)(p15q22) with NUP98-DDX10 fusion gene in pediatric acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, **171**, 122-125.

Morerio, C., Acquila, M., Rosanda, C., Rapella, A., Tassano, E., Micalizzi, C. and Panarello, C. (2005) t(9;11)(p22;p15) with NUP98-LEDGF fusion gene in pediatric acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, **29**, 467-470.

Mrozek, K. (2008) Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol*, **35**, 365-377.

Mueller, B.U. and Pabst, T. (2006) C/EBPalpha and the pathophysiology of acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*, **13**, 7-14.

Mueller, D., Bach, C., Zeisig, D., Garcia-Cuellar, M.P., Monroe, S., Sreekumar, A., Zhou, R., Nesvizhskii, A., Chinnaiyan, A., Hess, J.L. and Slany, R.K. (2007) A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood*, **110**, 4445-4454.

Mullighan, C.G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C.B., Coustan-Smith, E., Dalton, J.D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S.B., Su, X., Pui, C.H., Relling, M.V., Evans, W.E., Shurtleff, S.A. and Downing, J.R. (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, **446**, 758-764.

Mullighan, C.G., Miller, C.B., Radtke, I., Phillips, L.A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T.P., Le Beau, M.M., Pui, C.H., Relling, M.V., Shurtleff, S.A. and Downing, J.R. (2008) BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*, **453**, 110-114.

Mullighan, C.G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L.A., Miller, C.B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B.A., Harvey, R.C., Chen, I.M., Clifford, R.J., Carroll, W.L., Reaman, G., Bowman, W.P., Devidas, M., Gerhard, D.S., Yang, W., Relling, M.V., Shurtleff, S.A., Campana, D., Borowitz, M.J., Pui, C.H., Smith, M., Hunger, S.P., Willman, C.L. and Downing, J.R. (2009) Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, **360**, 470-480.

Nakamura, T., Largaespada, D.A., Lee, M.P., Johnson, L.A., Ohyashiki, K., Toyama, K., Chen, S.J., Willman, C.L., Chen, I.M., Feinberg, A.P., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Shaughnessy, J.D., Jr. (1996) Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet*, **12**, 154-158.

Nakamura, T., Yamazaki, Y., Hatano, Y. and Miura, I. (1999) NUP98 is fused to PMX1 homeobox gene in human acute myelogenous leukemia with chromosome translocation t(1;11)(q23;p15). *Blood*, **94**, 741-747.

Nebral, K., Konig, M., Schmidt, H.H., Lutz, D., Sperr, W.R., Kalwak, K., Brugger, S., Dworzak, M.N., Haas, O.A. and Strehl, S. (2005) Screening for NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies by fluorescence in situ hybridization. *Haematologica*, **90**, 746-752.

Nemeth, M.J., Cline, A.P., Anderson, S.M., Garrett-Beal, L.J. and Bodine, D.M. (2005) Hmgb3 deficiency deregulates proliferation and differentiation of common lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*, **105**, 627-634.

Nemeth, M.J., Curtis, D.J., Kirby, M.R., Garrett-Beal, L.J., Seidel, N.E., Cline, A.P. and Bodine, D.M. (2003) Hmgb3: an HMG-box family member expressed in primitive hematopoietic cells that inhibits myeloid and B-cell differentiation. *Blood*, **102**, 1298-1306.

Nemeth, M.J., Kirby, M.R. and Bodine, D.M. (2006) Hmgb3 regulates the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13783-13788.

Nishiyama, M., Arai, Y., Tsunematsu, Y., Kobayashi, H., Asami, K., Yabe, M., Kato, S., Oda, M., Eguchi, H., Ohki, M. and Kaneko, Y. (1999) 11p15 translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*, **26**, 215-220.

Okada, Y., Feng, Q., Lin, Y., Jiang, Q., Li, Y., Coffield, V.M., Su, L., Xu, G. and Zhang, Y. (2005) hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell*, **121**, 167-178.

Ono, R., Nakajima, H., Ozaki, K., Kumagai, H., Kawashima, T., Taki, T., Kitamura, T., Hayashi, Y. and Nosaka, T. (2005) Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple-lineage leukemogenesis. *J Clin Invest*, **115**, 919-929.

Owens, B.M. and Hawley, R.G. (2002) HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*, **20**, 364-379.

Palmqvist, L., Argiropoulos, B., Pineault, N., Abramovich, C., Sly, L.M., Krystal, G., Wan, A. and Humphries, R.K. (2006) The Flt3 receptor tyrosine kinase collaborates with NUP98-HOX fusions in acute myeloid leukemia. *Blood*, **108**, 1030-1036.

Palmqvist, L., Pineault, N., Wasslavik, C. and Humphries, R.K. (2007) Candidate genes for expansion and transformation of hematopoietic stem cells by NUP98-HOX fusion genes. *PLoS One*, **2**, e768.

Pan, Q., Zhu, Y.J., Gu, B.W., Cai, X., Bai, X.T., Yun, H.Y., Zhu, J., Chen, B., Weng, L., Chen, Z., Xue, Y.Q. and Chen, S.J. (2008) A new fusion gene NUP98-IQCG identified in an acute T-lymphoid/myeloid leukemia with a t(3;11)(q29q13;p15)del(3)(q29) translocation. *Oncogene*, **27**, 3414-3423.

Panagopoulos, I., Fioretos, T., Isaksson, M., Larsson, G., Billstrom, R., Mitelman, F. and Johansson, B. (2002) Expression of NUP98/TOP1, but not of TOP1/NUP98, in a treatment-related myelodysplastic syndrome with t(10;20;11)(q24;q11;p15). *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 249-254.

Panagopoulos, I., Isaksson, M., Billstrom, R., Strombeck, B., Mitelman, F. and Johansson, B. (2003) Fusion of the NUP98 gene and the homeobox gene HOXC13 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer*, **36**, 107-112.

Panagopoulos, I., Kerndrup, G., Carlsen, N., Strombeck, B., Isaksson, M. and Johansson, B. (2007) Fusion of NUP98 and the SET binding protein 1 (SETBP1) gene in a paediatric acute T cell lymphoblastic leukaemia with t(11;18)(p15;q12). *Br J Haematol*, **136**, 294-296.

Panarello, C., Rosanda, C. and Morerio, C. (2002) Cryptic translocation t(5;11)(q35;p15.5) with involvement of the NSD1 and NUP98 genes without 5q deletion in childhood acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **35**, 277-281.

Passegue, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E. and Weissman, I.L. (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100 Suppl 1**, 11842-11849.

Paulsson, K. and Johansson, B. (2009) High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **48**, 637-660.

Perez-Caro, M., Cobaleda, C., Gonzalez-Herrero, I., Vicente-Duenas, C., Bermejo-Rodriguez, C., Sanchez-Beato, M., Orfao, A., Pintado, B., Flores, T., Sanchez-Martin, M., Jimenez, R., Piris, M.A. and Sanchez-Garcia, I. (2009) Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment. *Embo J*, **28**, 8-20.

Perez-Vera, P., Montero-Ruiz, O., Frias, S., Rivera-Luna, R., Valladares, A., Arenas, D., Paredes-Aguilera, R. and Carnevale, A. (2008) Multiple copies of RUNX1:

description of 14 new patients, follow-up, and a review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet*, **180**, 129-134.

Petit, A., Radford, I., Waill, M.C., Romana, S. and Berger, R. (2008) NUP98-NSD1 fusion by insertion in acute myeloblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, **180**, 43-46.

Petit, A., Ragu, C., Della-Valle, V., Mozziconacci, M.J., Lafage-Pochitaloff, M., Soler, G., Schluth, C., Radford, I., Ottolenghi, C., Bernard, O.A., Penard-Lacronique, V. and Romana, S.P. (2010) NUP98-HMGB3: a novel oncogenic fusion. *Leukemia*, **24**, 654-658.

Pineault, N., Abramovich, C. and Humphries, R.K. (2005) Transplantable cell lines generated with NUP98-Hox fusion genes undergo leukemic progression by Meis1 independent of its binding to DNA. *Leukemia*.

Pineault, N., Abramovich, C., Ohta, H. and Humphries, R.K. (2004) Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol*, **24**, 1907-1917.

Pineault, N., Buske, C., Feuring-Buske, M., Abramovich, C., Rosten, P., Hogge, D.E., Aplan, P.D. and Humphries, R.K. (2003) Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia-specific fusion gene NUP98-HOXD13 in concert with Meis1. *Blood*, **101**, 4529-4538.

Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K. and Young, R.A. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, **122**, 517-527.

Potenza, L., Sinigaglia, B., Luppi, M., Morselli, M., Saviola, A., Ferrari, A., Riva, G., Zucchini, P., Giacobbi, F., Emilia, G., Temperani, P. and Torelli, G. (2004) A t(11;20)(p15;q11) may identify a subset of nontherapy-related acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, **149**, 164-168.

Powers, M.A., Forbes, D.J., Dahlberg, J.E. and Lund, E. (1997) The vertebrate GLFG nucleoporin, Nup98, is an essential component of multiple RNA export pathways. *J Cell Biol*, **136**, 241-250.

Pritchard, C.E., Fornerod, M., Kasper, L.H. and van Deursen, J.M. (1999) RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J Cell Biol*, **145**, 237-254.

Ragu, C. (2009) Etude du rôle de SRF dans l'hématopoïèse normale et implication dans la transformation de la lignée mégacaryocytaire. *Ecole Doctorale B2T Biologie Biotechnologie*. Université Paris Diderot, Paris, p. 213.

Rao, C.V., Yamada, H.Y., Yao, Y. and Dai, W. (2009) Enhanced genomic instabilities caused by deregulated microtubule dynamics and chromosome segregation: a perspective from genetic studies in mice. *Carcinogenesis*, **30**, 1469-1474.

Rayasam, G.V., Wendling, O., Angrand, P.O., Mark, M., Niederreither, K., Song, L., Lerouge, T., Hager, G.L., Chambon, P. and Losson, R. (2003) NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. *Embo J*, **22**, 3153-3163.

Raza-Egilmez, S.Z., Jani-Sait, S.N., Grossi, M., Higgins, M.J., Shows, T.B. and Aplan, P.D. (1998) NUP98-HOXD13 gene fusion in therapy-related acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*, **58**, 4269-4273.

Reader, J.C., Meekins, J.S., Gojo, I. and Ning, Y. (2007) A novel NUP98-PHF23 fusion resulting from a cryptic translocation t(11;17)(p15;p13) in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **21**, 842-844.

Remontet, L., Buemi, A., Velten, M., Jougla, E. and Estève, J. (2002) *Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000*. Actis, Paris.

Renneville, A., Boissel, N., Zurawski, V., Llopis, L., Biggio, V., Nibourel, O., Philippe, N., Thomas, X., Dombret, H. and Preudhomme, C. (2009) Wilms tumor 1 gene mutations are associated with a higher risk of recurrence in young adults with acute myeloid leukemia: a Study From the Acute Leukemia French Association. *Cancer*, **115**, 3719-3727.

Renneville, A., Roumier, C., Biggio, V., Nibourel, O., Boissel, N., Fenaux, P. and Preudhomme, C. (2008) Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*, **22**, 915-931.

Romana, S.P., Le Coniat, M. and Berger, R. (1994) t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **9**, 186-191.

Romana, S.P., Radford-Weiss, I., Ben Abdelali, R., Schluth, C., Petit, A., Dastugue, N., Talmant, P., Bilhou-Nabera, C., Mugneret, F., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.J., Andrieu, J., Lai, J.L., Terre, C., Rack, K., Cornillet-Lefebvre, P., Luquet, I., Nadal, N., Nguyen-Khac, F., Perot, C., Van den Akker, J., Fert-Ferrer, S., Cabrol, C., Charrin, C., Tigaud, I., Poirel, H., Vekemans, M., Bernard, O.A. and Berger, R. (2006) NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies: a study of the Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique. *Leukemia*, **20**, 696-706.

Rosati, R., La Starza, R., Veronese, A., Aventin, A., Schwienbacher, C., Vallespi, T., Negrini, M., Martelli, M.F. and Mecucci, C. (2002) NUP98 is fused to the NSD3 gene in acute myeloid leukemia associated with t(8;11)(p11.2;p15). *Blood*, **99**, 3857-3860.

Rosenbauer, F. and Tenen, D.G. (2007) Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*, **7**, 105-117.

Rowe, J.M. (2009) Optimal management of adults with ALL. *Br J Haematol*, **144**, 468-483.

Rufer, N., Brummendorf, T.H., Kolvraa, S., Bischoff, C., Christensen, K., Wadsworth, L., Schulzer, M. and Lansdorp, P.M. (1999) Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med*, **190**, 157-167.

Satoh, C. and Ogata, K. (2006) Hypothesis: myeloid-restricted hematopoietic stem cells with self-renewal capacity may be the transformation site in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, **30**, 491-495.

Sauvageau, G., Lansdorp, P.M., Eaves, C.J., Hogge, D.E., Dragowska, W.H., Reid, D.S., Largman, C., Lawrence, H.J. and Humphries, R.K. (1994) Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12223-12227.

Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, M.F., Haferlach, T., Hiddemann, W. and Falini, B. (2005) Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, **106**, 3733-3739.

Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and Cavalli, G. (2007) Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, **128**, 735-745.

Shen, W.F., Montgomery, J.C., Rozenfeld, S., Moskow, J.J., Lawrence, H.J., Buchberg, A.M. and Largman, C. (1997) AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol*, **17**, 6448-6458.

Shilatifard, A., Lane, W.S., Jackson, K.W., Conaway, R.C. and Conaway, J.W. (1996) An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. *Science*, **271**, 1873-1876.

Shimada, H., Arai, Y., Sekiguchi, S., Ishii, T., Tanitsu, S. and Sasaki, M. (2000) Generation of the NUP98-HOXD13 fusion transcript by a rare translocation, t(2;11)(q31;p15), in a case of infant leukaemia. *Br J Haematol*, **110**, 210-213.

Shipley, J.L. and Butera, J.N. (2009) Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol*, **37**, 649-658.

Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A. and Orkin, S.H. (1997) A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *Embo J*, **16**, 3965-3973.

So, C.W., Karsunky, H., Passegue, E., Cozzio, A., Weissman, I.L. and Cleary, M.L. (2003a) MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. *Cancer Cell*, **3**, 161-171.

So, C.W., Karsunky, H., Wong, P., Weissman, I.L. and Cleary, M.L. (2004) Leukemic transformation of hematopoietic progenitors by MLL-GAS7 in the absence of Hoxa7 or Hoxa9. *Blood*, **103**, 3192-3199.

So, C.W., Lin, M., Ayton, P.M., Chen, E.H. and Cleary, M.L. (2003b) Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell*, **4**, 99-110.

Somervaille, T.C. and Cleary, M.L. (2006) Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, **10**, 257-268.

Somervaille, T.C., Matheny, C.J., Spencer, G.J., Iwasaki, M., Rinn, J.L., Witten, D.M., Chang, H.Y., Shurtleff, S.A., Downing, J.R. and Cleary, M.L. (2009) Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells. *Cell Stem Cell*, **4**, 129-140.

Stubbs, M.C., Kim, Y.M., Krivtsov, A.V., Wright, R.D., Feng, Z., Agarwal, J., Kung, A.L. and Armstrong, S.A. (2008) MLL-AF9 and FLT3 cooperation in acute myelogenous leukemia: development of a model for rapid therapeutic assessment. *Leukemia*, **22**, 66-77.

Sutherland, H.G., Newton, K., Brownstein, D.G., Holmes, M.C., Kress, C., Semple, C.A. and Bickmore, W.A. (2006) Disruption of Ledgf/Psip1 results in perinatal mortality and homeotic skeletal transformations. *Mol Cell Biol*, **26**, 7201-7210.

Takeda, A., Sarma, N.J., Abdul-Nabi, A.M. and Yaseen, N.R. (2010) Inhibition of CRM1-mediated nuclear export of transcription factors by leukemogenic NUP98 fusion proteins. *J Biol Chem*, **285**, 16248-16257.

Taketani, T., Taki, T., Nakamura, H., Taniwaki, M., Masuda, J. and Hayashi, Y. (2009) NUP98-NSD3 fusion gene in radiation-associated myelodysplastic syndrome with t(8;11)(p11;p15) and expression pattern of NSD family genes. *Cancer Genet Cytogenet*, **190**, 108-112.

Taketani, T., Taki, T., Ono, R., Kobayashi, Y., Ida, K. and Hayashi, Y. (2002a) The chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in acute myeloid leukemia results in fusion of the NUP98 gene with a HOXA cluster gene, HOXA13, but not HOXA9. *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 437-443.

Taketani, T., Taki, T., Shibuya, N., Ito, E., Kitazawa, J., Terui, K. and Hayashi, Y. (2002b) The HOXD11 gene is fused to the NUP98 gene in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q31;p15). *Cancer Res*, **62**, 33-37.

Taketani, T., Taki, T., Shibuya, N., Kikuchi, A., Hanada, R. and Hayashi, Y. (2002c) Novel NUP98-HOXC11 fusion gene resulted from a chromosomal break within exon 1 of HOXC11 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Cancer Res*, **62**, 4571-4574.

Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S. and Leder, P. (1982) Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 7837-7841.

Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M. and Ehninger, G. (2006) Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, **107**, 4011-4020.

Tosi, S., Ballabio, E., Teigler-Schlegel, A., Boultwood, J., Bruch, J. and Harbott, J. (2005) Characterization of 6q abnormalities in childhood acute myeloid leukemia and identification of a novel t(6;11)(q24.1;p15.5) resulting in a NUP98-C6orf80 fusion in a case of acute megakaryoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **44**, 225-232.

Tosic, N., Stojiljkovic, M., Colovic, N., Colovic, M. and Pavlovic, S. (2009) Acute myeloid leukemia with NUP98-HOXC13 fusion and FLT3 internal tandem duplication mutation: case report and literature review. *Cancer Genet Cytogenet*, **193**, 98-103.

Travers, A.A. (2003) Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? *EMBO Rep*, **4**, 131-136.

Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W. and Orkin, S.H. (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, **371**, 221-226.

Vainchenker, W., Dusa, A. and Constantinescu, S.N. (2008) JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol*, **19**, 385-393.

van Zutven, L.J., Onen, E., Velthuizen, S.C., van Drunen, E., von Bergh, A.R., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Veronese, A., Mecucci, C., Negrini, M., de Greef, G.E. and Beverloo, H.B. (2006) Identification of NUP98 abnormalities in acute leukemia: JARID1A (12p13) as a new partner gene. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 437-446.

Vaquerizas, J.M., Suyama, R., Kind, J., Miura, K., Luscombe, N.M. and Akhtar, A. (2010) Nuclear pore proteins nup153 and megator define transcriptionally active regions in the Drosophila genome. *PLoS Genet*, **6**, e1000846.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A. and Bloomfield, C.D. (2009) The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*.

Vrooman, L.M. and Silverman, L.B. (2009) Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr*, **21**, 1-8.

Walkley, C.R., Olsen, G.H., Dworkin, S., Fabb, S.A., Swann, J., McArthur, G.A., Westmoreland, S.V., Chambon, P., Scadden, D.T. and Purton, L.E. (2007a) A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell*, **129**, 1097-1110.

Walkley, C.R., Shea, J.M., Sims, N.A., Purton, L.E. and Orkin, S.H. (2007b) Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell*, **129**, 1081-1095.

Wang, C.Q., Jacob, B., Nah, G.S. and Osato, M. (2010) Runx family genes, niche, and stem cell quiescence. *Blood Cells Mol Dis*.

Wang, G.G., Cai, L., Pasillas, M.P. and Kamps, M.P. (2007) NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nat Cell Biol*, **9**, 804-812.

Wang, G.G., Song, J., Wang, Z., Dormann, H.L., Casadio, F., Li, H., Luo, J.L., Patel, D.J. and Allis, C.D. (2009) Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature*, **459**, 847-851.

Waterstrat, A. and Van Zant, G. (2009) Effects of aging on hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Immunol*, **21**, 408-413.

Wei, J., Wunderlich, M., Fox, C., Alvarez, S., Cigudosa, J.C., Wilhelm, J.S., Zheng, Y., Cancelas, J.A., Gu, Y., Jansen, M., Dimartino, J.F. and Mulloy, J.C. (2008)

Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell*, **13**, 483-495.

Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P.t., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T. and Aster, J.C. (2004) Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, **306**, 269-271.

Wong, D.J., Liu, H., Ridky, T.W., Cassarino, D., Segal, E. and Chang, H.Y. (2008) Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell*, **2**, 333-344.

Wu, X., Kasper, L.H., Mantcheva, R.T., Mantchev, G.T., Springett, M.J. and van Deursen, J.M. (2001) Disruption of the FG nucleoporin NUP98 causes selective changes in nuclear pore complex stoichiometry and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3191-3196.

Xiao, H., Sandaltzopoulos, R., Wang, H.M., Hamiche, A., Ranallo, R., Lee, K.M., Fu, D. and Wu, C. (2001) Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. *Mol Cell*, **8**, 531-543.

Xylourgidis, N. and Fornerod, M. (2009) Acting out of character: regulatory roles of nuclear pore complex proteins. *Dev Cell*, **17**, 617-625.

Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Mansson, R., Sigvardsson, M. and Jacobsen, S.E. (2005) Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood*, **105**, 2717-2723.

Yassin, E.R., Abdul-Nabi, A.M., Takeda, A. and Yaseen, N.R. (2010) Effects of the NUP98-DDX10 oncogene on primary human CD34+ cells: role of a conserved helicase motif. *Leukemia*.

Yokoyama, A. and Cleary, M.L. (2008) Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell*, **14**, 36-46.

Yokoyama, A., Somervaille, T.C., Smith, K.S., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M. and Cleary, M.L. (2005) The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell*, **123**, 207-218.

Yu, B.D., Hess, J.L., Horning, S.E., Brown, G.A. and Korsmeyer, S.J. (1995) Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature*, **378**, 505-508.

Yun, K., Garel, S., Fischman, S. and Rubenstein, J.L. (2003) Patterning of the lateral ganglionic eminence by the Gsh1 and Gsh2 homeobox genes regulates striatal and olfactory bulb histogenesis and the growth of axons through the basal ganglia. *J Comp Neurol*, **461**, 151-165.

Zhang, L., Alsabeh, R., Mecucci, C., La Starza, R., Gorello, P., Lee, S., Lill, M. and Schreck, R. (2007) Rare t(1;11)(q23;p15) in therapy-related myelodysplastic syndrome evolving into acute myelomonocytic leukemia: a case report and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet*, **178**, 42-48.

Zhang, X., Chen, S., Yoo, S., Chakrabarti, S., Zhang, T., Ke, T., Oberti, C., Yong, S.L., Fang, F., Li, L., de la Fuente, R., Wang, L., Chen, Q. and Wang, Q.K. (2008) Mutation in nuclear pore component NUP155 leads to atrial fibrillation and early sudden cardiac death. *Cell*, **135**, 1017-1027.