



HAL
open science

**Etude des micro-ARNs sériques dans les leucémies
aiguës myéloïdes : vers une meilleure compréhension
épigénétique de la leucémogénèse et une nouvelle
approche de l'évaluation pronostique**

Estelle Pedrono

► **To cite this version:**

Estelle Pedrono. Etude des micro-ARNs sériques dans les leucémies aiguës myéloïdes : vers une meilleure compréhension épigénétique de la leucémogénèse et une nouvelle approche de l'évaluation pronostique. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2014. Français. NNT : 2014ANGE0017 . tel-01475345

HAL Id: tel-01475345

<https://theses.hal.science/tel-01475345>

Submitted on 23 Feb 2017

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.

Thèse de Doctorat

Estelle PEDRONO

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie Santé Nantes Angers*

Discipline : *Biologie cellulaire CNU65*

Unité de recherche : *unité de recherche mixte INSERM U892 CNRS6299 Equipe 7a institut de
Biologie en Santé PBH-IRIS Allée du pont Centre Hospitalier Universitaire d'Angers 4, rue Larrey
49933 Angers Cedex*

Soutenu le *19 Décembre 2014*

Thèse N° : *1416*

Etude des micro-ARNs sériques dans les leucémies aiguës myéloïdes: vers une meilleure compréhension épigénétique de la leucémogénèse et une nouvelle approche de l'évaluation pronostique

JURY

Rapporteurs : **Valérie UGO**, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Brest
Pascal MOSSUZ, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Grenoble

Examineurs : **Mathilde HUNAUT-BERGER**, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université d'Angers
Norbert IFRAH, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université d'Angers

Invité(s) : **Philippe GUARDIOLA**, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université d'Angers

Directeur de Thèse : **Philippe GUARDIOLA**, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université d'Angers

Co-directeur de Thèse : **Norbert IFRAH**, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université d'Angers

Au directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Philippe Guardiola,

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse,

Pour le soutien précieux dans la réalisation de ce mémoire,

Cette thèse est l'occasion de vous adresser mes remerciements les plus sincères et mon plus grand respect.

Au co-directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Norbert Ifrah,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être l'un de mes co-directeurs de thèse malgré votre temps précieux,

Pour le soutien que vous m'avez apporté avec l'association ALARME pour que je puisse effectuer ma thèse dans les meilleures conditions.

Veillez trouver ici le témoignage de mon plus grand respect et de ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Norbert Ifrah,

A Madame le Professeur Mathilde Hunault-Berger,

A Madame le Professeur Valérie Ugo,

A Monsieur le Professeur Pascal Mossuz,

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail,

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon plus grand respect.

A Monsieur le Docteur Yves Delneste,

Pour avoir eu la gentillesse de m'accueillir dans votre laboratoire (Inserm U892 Equipe 7a),

Veillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

Avant-propos

Par avance, je tiens à m'excuser si des personnes ont été oubliées dans ses remerciements.

Tout d'abord je tiens à remercier tout le laboratoire de biologie moléculaire d'hématologie, d'abord pour m'avoir appris à tenir une pipette en Master et enfin pour avoir fait votre possible pour me faciliter l'accès aux appareils durant cette toute fin de thèse. Donc un grand merci à Anne B, Françoise, Valérie, Christelle, Anaëlle et Odile.

Merci à mes merveilleuses collègues que sont ma Didi et Anne. Anne, un énorme merci pour ton grand talent d'écoute, tes conseils très souvent d'une grande sagesse, ton soutien moral et pour tout ce que tu as pu m'apprendre et m'apprendras encore. Ainsi que pour tes talents de chanteuses qui nous ont souvent permis de bien rigoler. Ma Didi que te dire, merci ne suffit pas dans mon cas... non seulement tu as été d'une aide précieuse pour les différentes manip et la rigueur de tes contrôles, pour tes conseils de rédaction, mais bien plus qu'un soutien moral je pense sincèrement que je ne serais pas arrivé au bout de cette thèse sans ta présence. Ton habileté à me remotiver et à perpétuellement sortir le positif de chaque situation mon permis d'avancer. Non seulement j'ai trouvé en toi une merveilleuse collègue, toujours souriante, drôle et de bonne humeur, mais aussi une véritable amie en qui j'ai une totale confiance, et sur qui je peux compter dans les bons comme dans les mauvais moments. Bien évidemment je ne peux pas te remercier en oubliant ta maman et olivier qui m'ont concocté de merveilleux repas, très important en période de rédaction, même si décidément on n'est pas d'accord sur les rillettes.

Un grand merci aussi à Isa, Laulau, Céline B et Julie qui ont toujours été à l'écoute, m'ont donné de bons conseils, m'ont remotivé, réconforté... Isa et laulau pour toutes nos conversations de filles, nos petites séances shoppings. Sache Isa que tu vas beaucoup me manquer !

Merci aussi à Céline L et Patricia, toujours prêtes à rendre service.

Un énorme merci à mon juju, ma coquille et mon poussin pour l'ensemble de leurs œuvres tant en soirée (capitaine, tour du james, tortillement du torse, les vieilles charrues), que dans la vie de tous les jours vous êtes pour moi de véritables amis sur qui je peux compter, avec qui je rigole toujours autant. Et vous avez toujours été là pour moi, même dans les moments un peu difficiles. Petite dédicace à juju qui est le seul à m'avoir donné une leçon de marche avec talons , pour être la seule personne à imiter aussi bien le poireau, pour avoir tenter de m'endormir avec une berceuse avec simplement 3 notes magiques.... à mon poussin mon

Avant-propos

binôme de rock salsa au boléro et pour son remarquable jeux à la belote, je sais que tu comprendras... et à ma coquille formidable compagnon de crêpes au sucre aux vieilles, et pour sa tentative d'imitation de keen'v à mon anniversaire et pour nous avoir permis à son anniv de rencontrer briguite ultime défenseur végétarien. Et merci à Céline de supporter au quotidien notre juju national.

D'ailleurs merci au petit lionceau pour avoir été le co-architecte et le pousseur officiel de jagger. Et un grand merci pour le simple fait d'être mayennais et de me permettre de me rappeler tous les jours que la Sarthe bah c'est vachement mieux que la Mayenne. Et que quoi qu'il arrive les sarthois tiennent toujours mieux l'alcool !

Il est pour moi tout naturel de remercier le James... et oui il fait un peu parti de la famille, et il a été le théâtre de nos plus belles réalisations de jaggerbomb.

Merci à Marie, Soph et pauline pour toutes nos sorties ciné entre filles, nos moments shopping et nos virées au James. Nos discussions, remises en question. Sachez les filles que vous êtes géniales surtout ne changez rien.

Merci à Camille, Caro, Margaret, Soph et Marie pour apporter vôtre bonne humeur à la danse, c'est une véritable bouffée d'oxygène.

Merci à tous les anciens thésards du labo avec qui j'ai passé de bonnes soirées et de bons moments. Merci à toto la cabriole ou encore l'homme qui murmure à l'oreille des ficus, j'entends encore résonner « toto c'est le ficus qui te parle ». Merci à toi Toinou pour m'avoir permis d'acquérir la culture musicale d'une personne de 80 ans, et aussi pour être à ce jour le seul véritable sosie de Joe Dassin, pour avoir partagé ton bureau en M2. Merci à toi Laurent P pour m'avoir supporté comme voisine de bureau et pour ces nombreuses soirées. Merci à toi Yveline pour tes petits repas toujours très bon, ton écoute, tes conseils, les soirées zumba avec Céline.

Merci à Erwan et Simon pour toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter, pour le FACS, l'immunofluo etc.... Et merci à Erwan pour avoir eu le courage de m'avoir en voisine de bureau, je sais que ça été dur pour toi de te séparer de Laurence.

Merci à Mélanie P avec qui j'ai passé de bons moments au labo comme hors de France.

Avant-propos

Merci à ma petite Marion ma sage-femme préférée !! Parce qu'on est je crois les seules filles à s'être fait refouler du boléro, puis de la rue du boléro, qu'il faut toujours un mot de passe pour y rentrer « poussin » ! Et que ce n'est pas tout les jours qu'on à les cuis mouillées...

Et enfin je dédie cette thèse à mes parents. Des personnes absolument fabuleuses, qui ont toujours tout fait pour que je fasse ce qui me plaisait, qui m'ont soutenu dans toutes mes décisions. Et sans qui bien évidemment je n'aurais jamais pu soutenir ma thèse. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, je vous aime !

Abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique	ICR: imprinting control region
AGO: argonaute	IDH1: isocitrate dehydrogenase 1
ARN: acide ribonucléique	IDH2: isocitrate dehydrogenase 2
ASXL1: additional sex combs like 1	Inv(16): inversion du chromosome 16
ATRA: acide tout- <i>trans</i> rétinoïque	ITD: duplication interne en tandem
BCR: break cluster region	Kb: kilobase
CBFB: core-binding factor, beta subunit	KDa: kilo Dalton
CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein alpha	LAM: leucémie aiguë myéloïde
CIVD: coagulation intravasculaire disséminée	LAM3v: LAM3 variante
CR: rémission complète	LAL: leucémie aiguë lymphoblastique
CTCF: CCCTC-binding factor	LAP: leucémie aiguë promyélocytaire
DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene 8	Mb: Méga bases
DICER: double-stranded RNA-specific endoribonuclease	MDM2: mouse double minute 2 homolog
DIO3: deiodinase, iodothyronine, type III	MEG3: maternally expressed gene 3
DLK1: delta-like 1 homolog	MEG8: maternally expressed gene 8
DMR: differentially methylated region	MEG9: maternally expressed gene 9
DNMT: DNA méthyltransférase	MEIS1: myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog
DNMT3A: DNA méthyltransférase 3A	MiRISC: miRNA associated multiprotein RNA-induced silencing complex
EZH2: enhancer of zeste homolog 2	MLL: mixed lineage leukemia
FAB: French-American-British	MYH11: myosin, heavy chain 11
FLT3: Fms-like tyrosine kinase 3	NK: normal karyotype
H2: Histone 2	NPM1: nucléophosmine 1
HAT: histone acétyl-transférase	NuMa: nuclear mitotic apparatus
HDAC: histone déacétylase	OMS: organisation mondiale de la santé
HLA: human leukocyte antigen	PBX: pre-B-cell leukemia homeobox
H3K9me3: histone 3 lysine 9 tri-méthylée	PCR: polymérase chain reaction
HMT: histone méthyltransférase	PLZF: promyelocytic leukemia zinc finger
HOX: homeobox	PML: promyelocytic leukemia
HSP90: heat shock protein 90kd	RAR: récepteur à l'acide rétinoïque

Abréviations

RAR α : récepteur à l'acide rétinoïque α

RISC: RNA-induced silencing complex

RTL1: retrotransposon-Like 1

RUNX1: runt-related transcription factor 1

RUNX1T1: runt-related transcription factor 1;
translocated to,

SnoRNA: small nucleolar-RNA

SNORD: small nucleolar RNA, C/D box

STAT5B: signal transducer and activator of
transcription 5B

t(8;21): translocation (8;21)

TALE: transcription activator-like effector

TET2: Tet methylcytosine dioxygenase 2

TKD: domaine tyrosine kinase

tPA: activateur tissulaire du plasminogène

UTR: untranslated region

INTRODUCTION.....	11
1 LES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES.....	12
1.1 EPIDÉMIOLOGIE DES LAM	12
1.2 PRÉSENTATION CLINIQUE DES PATIENTS ATTEINTS DE LAM.....	12
1.3 DIAGNOSTIC DES LAM.....	13
1.3.1 Cytologie des LAM	13
1.3.2 Immunologie des LAM.....	17
1.3.3 Cytogénétique et biologie moléculaire des LAM	17
1.4 LEUCÉMOGÉNÈSE DES LAM.....	19
1.4.1 Mutations des gènes de classe I et de classe II et LAM	19
1.4.2 Mutations des gènes modificateurs épigénétiques et LAM	20
2 LES LEUCÉMIES AIGUËS PROMYÉLOCYTAIRES	24
2.1 SUR LE PLAN CLINIQUE.....	25
2.2 SUR LE PLAN BIOLOGIQUE	26
2.2.1 Sur le plan cytologique	26
2.2.2 Sur le plan cytogénétique	27
2.2.3 Sur le plan moléculaire	29
2.2.4 Sur le plan immunophénotypique.....	31
3 RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE DE LA TRANSCRIPTION	31
3.1 LA MÉTHYLATION DE L'ADN.....	32
3.2 LES MODIFICATIONS DES HISTONES.....	32
3.3 L'EMPREINTE GÉNOMIQUE	36
3.3.1 La région <i>DLK1-DIO3</i>	36
3.4 ÉPIGÉNÉTIQUE ET LAM.....	40
4 LES MICRO-ARN.....	41
4.1 GÉNÉRALITÉS	41

Sommaire

4.2	BIOGÉNÈSE DES MICRO-ARN	41
4.3	LES MICRO-ARN CIRCULANTS	44
4.4	MICRO-ARN ET LAM	46
4.4.1	<i>Mir-196b</i>	48
4.4.2	<i>Mir-10a</i>	48
5	OBJECTIFS DE LA THÈSE	49
	RESULTATS	50
	DISCUSSION	100
	ANNEXE	106
	BIBLIOGRAPHIE	108

A microscopic view of numerous red blood cells, which are biconcave discs, appearing in shades of pink and red against a darker background. The cells are densely packed and vary in focus, with some in sharp foreground and others blurred in the background.

INTRODUCTION

1 LES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent un ensemble de pathologies dues à une pathologie clonale des cellules souches hématopoïétiques. Elles sont caractérisées par un arrêt de la différenciation hématopoïétique conduisant à une accumulation médullaire de cellules hématopoïétiques immatures, appelés blastes, et à une diminution de la production de cellules hématopoïétiques matures normales [1]. Le caractère aigu des LAM est défini par le potentiel évolutif rapide des symptômes et signes biologiques en rapport avec la maladie.

1.1 EPIDÉMIOLOGIE DES LAM

En France, on dénombre 3000 nouveaux cas de LAM par an. L'incidence des LAM est de l'ordre de 3 pour 100 000 habitants par an. Ces leucémies, qui affectent les individus des deux sexes avec une légère prédominance masculine, peuvent débiter à tout âge, mais touchent plus fréquemment les personnes âgées de plus de 65 ans. Elles peuvent être provoquées par l'exposition aux radiations ionisantes ou par des médicaments génotoxiques (chimiothérapies cytotoxiques) [1]. Certains facteurs environnementaux comme la cigarette et l'exposition au benzène augmentent le risque de développer une LAM [2].

1.2 PRÉSENTATION CLINIQUE DES PATIENTS ATTEINTS DE LAM

Les signes cliniques et symptômes associés aux LAM sont divers et peu spécifiques. Ils sont en rapport avec l'envahissement tumoral médullaire conduisant à une ou plusieurs cytopénies, et/ou à l'accumulation de blastes dans les vaisseaux (leucostase) ou au niveau de certains organes. Typiquement, sont observés chez ces patients: fatigue, pâleur, dyspnée d'effort, hémorragies, fièvre et infections en rapport avec une diminution respective des érythrocytes (anémie), des plaquettes (thrombopénie) et des leucocytes et polynucléaires neutrophiles (leucopénie, neutropénie). Les troubles respiratoires à type de dyspnée et de la conscience signent le plus souvent un tableau de leucostase en rapport avec une hyperleucocytose majeure [3]. L'invasion leucémique de divers tissus, incluant les organes

hématopoïétiques secondaires (foie, rate, ganglions lymphatiques), la peau, les gencives, les testicules et le système nerveux central, peut aussi conduire, respectivement, à l'apparition d'une hépatomégalie, d'une splénomégalie, d'adénopathies, de leucémides cutanées, d'une hypertrophie gingivale, d'une hypertrophie testiculaire, de dysesthésies de la louppe du menton et/ou d'autres paralysies périphériques [3].

1.3 DIAGNOSTIC DES LAM

Le diagnostic positif de LAM repose sur l'examen de la moelle osseuse, ou myélogramme, même si l'hémogramme souvent évocateur. Le diagnostic de LAM est posé devant l'identification d'au moins 20% de blastes leucémiques au niveau de la moelle osseuse et éventuellement dans le sang, après une coloration de May-Grunwald-Giemsa. Le plus souvent, ces cellules ont un noyau rond parfois irrégulier, avec 1 à 3 nucléoles distincts, et un cytoplasme de taille réduite [3]. Le cytoplasme contient parfois de fines granulations azurophiles et/ou des corps d'Auer en nombre variables (fins bâtonnets azurophiles). Les LAM se distinguent des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) par leurs caractéristiques cytologiques et cytométriques [3].

1.3.1 Cytologie des LAM

Au niveau cytologique, différents sous-types de LAM ont été identifiés, cette hétérogénéité étant en rapport avec le stade de différenciation auquel les cellules leucémiques se trouvent bloquées [3]. La méthode la plus courante de classification utilisée a été développée par le groupe French-American-British (FAB) (Figure 1). Cette classification a identifié neuf sous-types distincts de LAM qui diffèrent selon le stade de différenciation où se trouvent les cellules leucémiques. Cette distinction reposait sur l'apparence morphologique des blastes et des marquages cytochimiques (myélopéroxydase, noir Soudan, et estérases non spécifiques α -naphthylacétate et naphthylbutyrate) [3]. La classification des LAM a été remise à jour en 2008 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cette approche multidisciplinaire prend notamment en compte les caractéristiques génétiques, elle sera utile

dans la grande majorité des cas pour déterminer le pronostic et le traitement optimal. La classification OMS complète systématiquement la classification FAB (Figure 2).

Introduction

Abréviation FAB	Description cytologique	Particularités clinico-biologiques	Fréquence (% des LAM)
LAM0: LAM très peu différenciée	Myéloblastes > 90% sans granulation ni corps d'Auer, cytochimie MPO négative; expression d'antigènes myéloïdes.		2%
LAM1: LAM avec peu ou pas de maturation	Myéloblastes > 90% avec quelques granulations, un corps d'Auer, ou les 2; cytochimie MPO positive.		20%
LAM2: LAM avec maturation	Myéloblastes: 20 – 90% avec granulations et souvent un corps d'Auer volumineux, persistance d'une lignée granulocytaire.	Chlorome. t(8;21).	30%
LAM3: Leucémie aiguë promyélocytaire	Blastes (> 20 – 30%) hypergranuleux, contenant de très nombreux corps d'Auer.	CIVD fréquente. Sensibilité à l'ATRA. t(15;17).	10%
LAM4: Leucémie myélomonocytaire aiguë	Aspect de LAM2, avec monocytose sanguine > 5 G/L ou monocytose médullaire > 20%.	Hyperleucocytose fréquente. Inversion du chromosome 16 (LAM4 avec éosinophiles anormaux).	15%
LAM5: Leucémie aiguë monoblastique	LAM5a: peu de maturation (plus de 80% de monoblastes) ; LAM5b: maturation (< 80% de monoblastes). Cytochimie MPO négative ou finement positive, estérases NASDA positives et inhibées par le fluorure de sodium.	Localisations cutanées et muqueuses, rechutes neuro-méningées et CIVD fréquentes. Anomalies en 11q23, del(11), t(8;16), t(11;-).	15%
LAM6: Erythroleucémie	Erythroblastes > 50% (parfois très dysplasiques). Myéloblastes > 20% sur un décompte excluant les érythroblastes et les lymphocytes.	Caryotypes complexes.	5%
LAM7: Leucémie mégacaryoblastique	Les blastes sont des cellules mégacaryocytaires plus ou moins différenciées. Cytochimie MPO négative. L'immunophénotype est utile pour conforter le diagnostic.	Fibrose médullaire, Trisomie 21.	2%

Figure 1: Classification FAB des LAM.

(CIVD: coagulation intra-vasculaire disséminée; MPO: myéloperoxydase; NASDA: naphthol-ASD-acétate; ATRA: acide tout-trans rétinolique).

LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes

- LAM avec t(8;21)(q22;q22); réarrangement *RUNX1-RUNX1T1*.
 - LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); réarrangement *CBFβ-MYH11*.
 - LA promyélocytaire avec t(15;17)(q22;q12); réarrangement *PML-RARα*.
 - LAM avec t(9;11)(p22;q23); réarrangement *MLLT3-MLL*.
 - LAM avec t(6;9)(p23;q34); réarrangement *DEK-NUP214*.
 - LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVII*.
 - LAM (mégacaryocytaire) avec t(1;22)(p13;q13); réarrangement *RBM15-MKLI*.
 - LAM à pronostic favorable : avec mutations de *NPM1* sans *FLT3*, *CEBPA*
 - LAM à pronostic défavorables : avec mutations *FLT3*, *KIT*
-

LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies

- avec syndrome myélodysplasique ou syndrome myéloprolifératif/dysplasique préalable
 - avec des anomalies cytogénétiques identiques à celles des myélodysplasies
 - avec une dysplasie sur > 50% des cellules d'au moins 2 lignées myéloïdes
 - absence de radiothérapie ou chimiothérapie antérieure
 - pas d'anomalie cytogénétiques récurrentes
-

LAM post-chimio ou radiothérapie

- une seule entité quel que soit le traitement (devrait être notée avec l'anomalie cytogénétique associé)
-

LAM sans spécification particulière

- LAM avec différenciation minime
 - LAM sans maturation
 - LAM avec maturation
 - LA myélomonocytaire
 - LA monoblastique ou monocytaire
 - LA érythroblastique
 - LA mégacaryoblastique
 - LAM à composante basophile
 - Panmyélose aiguë avec myélofibrose
-

Sarcome granulocytaire

Proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle

- Réaction leucémoïde transitoire
 - LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle
-

Tumeur blastique plasmocytoïde dendritique

Figure 2: Classification OMS des LAM (2008).

1.3.2 Immunologie des LAM

Des examens immunologiques ont été secondairement utilisés pour conforter l'assignation de certaines LAM à un sous-groupe donné de la classification FAB comme pour les LAM0, LAM6 et LAM7 (Figure 3). Ils permettent aussi de distinguer les LAM très immatures des LAL.

Marqueurs	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Propres aux précurseurs								
HLA-DR	++	++	++	-	++	++	+/-	+/-
CD34	-	+	+	-	+	+	+	-
Pan-myéloïdes								
CD33	++	++	++	++	++	++	+/-	+/-
CD13	++	++	++	++	++	+	+/-	+/-
Anti-Myéloperoxydase	++	++	++	++	++	++	-	-
Associés à une lignée								
CD14 et CD68	+	+	+	+	++	++	-	-
Spécifiques d'une lignée								
CD41, CD42, CD61	-	-	-	-	-	-	-	++
Antiglycophorine A	-	-	-	-	-	-	+	-

Figure 3: Profils d'immunomarquage des différents sous-types FAB de LAM.

1.3.3 Cytogénétique et biologie moléculaire des LAM

L'importance du caryotype des blastes leucémiques quant à sa capacité à prédire la réponse initiale au traitement et la guérison à long terme a été reconnue dans les années 1980 [1]. Les analyses cytogénétiques des cellules leucémiques conduisent à l'identification d'anomalies chromosomiques clonales non-aléatoires retrouvées chez 50 à 70% des patients atteints de LAM [3]. Plusieurs sous-types de LAM selon la classification FAB sont associés à des anomalies cytogénétiques comme la t(15;17) pour les LAM3, l'inv(16) ou la t(16;16) pour les LAM4 avec éosinophiles, et la t(8;21) pour certaines LAM2. [3]. La présence d'une de ces quatre anomalies décrites ci-dessus permet d'assigner un pronostic favorable à un patient donné. D'autres anomalies ont permis de définir des groupes de risque cytogénétique dits

Introduction

intermédiaire et défavorable, les patients sans anomalie cytogénétique décelée, c'est-à-dire à caryotype normal soit 50% des patients étant initialement considérés comme ayant un pronostic intermédiaire [4].

Les progrès en biologie moléculaire ont secondairement permis de caractériser le groupe hétérogène des patients avec un caryotype de risque dit intermédiaire, dont la majorité sont en fait normaux [1]. Grâce aux techniques de biologie moléculaire, de nombreuses mutations ont été identifiées chez ces patients, permettant de mieux préciser leur pronostic (Figure 3). Aujourd'hui la recherche de mutations au niveau des gènes *NPM1*, *FLT3* et *CEBPA* est réalisée en routine [5]. La duplication interne en tandem de *FLT3* (*FLT3-ITD*) est associée à un pronostic défavorable [6]. En son absence, les mutations de *NPM1* sont de pronostic favorable, tout comme les doubles mutations de *CEBPA* [1]. Des mutations au niveau d'autres gènes ont été identifiées (Figure 4), dont la valeur pronostique n'est pas totalement précisée. En effet, certaines, comme celles affectant *DNMT3A*, peuvent être détectées en combinaison avec des mutations au niveau de *FLT3* et/ou de *NPM1* par exemple, rendant plus difficile l'analyse de leur potentiel pronostique [1].

	Fréquence dans les LAM	Fréquence dans les LAM à caryotype normal
<i>NPM1</i>	35%	50%
<i>CEBPA</i>	7%	8-19%
<i>FLT3-ITD</i>	20-25%	30-35%
<i>FLT3-TKD</i>	5%	14%
<i>KIT</i>	„	25%
<i>TET2</i>	8-12%	23%
<i>DNMT3A</i>	14-22%	20-33%
<i>IDH1, IDH2</i>	8-16%	30%
<i>ASXL1</i>	5-30%	environ 10%

Figure 4: Principaux gènes mutés dans les LAM [1].

Ainsi les méthodes de cytogénétiques ou de biologie moléculaire sont-elles devenues un élément essentiel du bilan pronostique effectué en routine, au diagnostic, chez les patients atteints d'une LAM. La combinaison des approches morphologiques, immunologiques et cytogénétiques et moléculaires permet d'affiner le pronostic des patients en termes de réponse initiale au traitement, de risque de rechute et de survie. Ainsi elles permettent d'orienter le choix du type de traitement à mettre en place dans une optique d'optimiser le rapport bénéfice / risque pour le patient. L'approche moléculaire permet aussi de suivre l'efficacité des traitements par une quantification extrêmement sensible d'un marqueur spécifique des cellules leucémiques d'un patient donné (mutation du gène *NPM1*, par exemple). Ce suivi de la maladie résiduelle, qui permet d'adapter l'intensité du traitement à son évolution, a aussi la capacité à prédire précocément la survenue d'une rechute [3].

1.4 LEUCÉMOGÉNÈSE DES LAM

De nombreux facteurs participent à la leucémogénèse des LAM, incluant prédisposition génétique, mutations géniques, dérégulation épigénétiques et expression anormale de micro-ARNs.

1.4.1 Mutations des gènes de classe I et de classe II et LAM

Des modèles *in vitro* et pré-cliniques ont montré que plusieurs mutations étaient nécessaires pour aboutir à une LAM. Ainsi, il est classiquement admis que la leucémogénèse des LAM se produit, en présence, d'une part de mutations activatrices au niveau de gènes dits de classe I qui stimulent les voies de transduction du signal et induisent la prolifération cellulaire, et d'autre part, de mutations au niveau de gènes dits de classe II qui affectent le plus souvent des facteurs de transcription et compromettent la différenciation hématopoïétique normale. Les mutations de *FLT3*, *KIT* et *RAS* appartiennent aux mutations de classe I. Les transcrits de fusion *RUNX1/RUNX1T1*, *CBFB/MYH11* et *PML/RARA* sont des exemples de mutations de classe II, tout comme celles affectant *CEBPA* et *RUNX1* [7,8].

De travaux plus récents ont mis en lumière la présence de mutations au niveau de gènes impliqués dans la régulation épigénétiques tels qu'*ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, et *TET2* [9]. Ces travaux ont montré que le schéma classique de leucémogénèse des LAM - mutations affectant des gènes des classes I et II - devait être repensé en y intégrant ces dernières [2].

1.4.2 Mutations des gènes modificateurs épigénétiques et LAM

De nouvelles mutations dans les gènes liés au contrôle épigénétique de la transcription, qui comprennent la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, ont été mises en évidence chez les patients atteints de LAM [2]. Cette nouvelle classe de gènes mutés inclut, sans s'y limiter: *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* et *TET2*. Les mécanismes par lesquels ces mutations contribuent au phénotype des LAM demeurent imparfaitement compris [1]. Il semble que leur rôle soit primordial pour l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques. La plupart de ces mutations semblent associées à un plus mauvais pronostic et sont plus fréquentes chez les patients âgés [1].

1.4.2.1 Les gènes HOX

Les vertébrés possèdent quatre complexes de gènes Hox, chaque groupe de gènes Hox étant situé sur un chromosome différent et l'ordre des gènes sur chaque chromosome étant identique. On considère que ces complexes sont issus d'une double duplication d'un chromosome ancestral au cours de l'évolution. Ainsi, une première duplication a créé un couple de complexes, puis ce couple s'est à nouveau dupliqué. Pour ces raisons, les gènes Hox sont considérés comme des paralogues. Chez l'homme, les gènes HOX sont répartis en quatre groupes, comprenant au total 39 gènes, et situés sur des chromosomes différents. Le locus HOXA, situé sur le chromosome 7, en p15, comprend 12 gènes. Le locus HOXB situé sur le chromosome 17, en q21, comprend dix gènes. Le locus HOXC, situé sur le chromosome 12, en q13, comprend neuf gènes. Enfin, le locus HOXD, situé sur le chromosome 2, en q31, en comprend huit. Pour chaque groupe, 13 paralogues sont disposés de la position 1 à 13 dans un ordre 3'-5' (Figure 5). Il existe un haut degré d'homologie dans leurs séquences et une certaine redondance fonctionnelle. Les gènes Hox sont caractérisés par la présence d'une boîte homéotique: une séquence conservée de 183 paires de bases qui est un

Introduction

motif hélice-tour-hélice. Le motif hélice-tour-hélice est constitué d'environ 20 acides aminés. Il est caractérisé par deux hélices α , qui sont en contact avec l'ADN et reliées par un tour court. Les protéines HOX, ayant une spécificité et une sélectivité limitée pour l'ADN, ont besoin d'interactions avec des cofacteurs comme PBX et MEIS pour augmenter leur affinité vis-à-vis d'une séquence d'ADN cible [10].

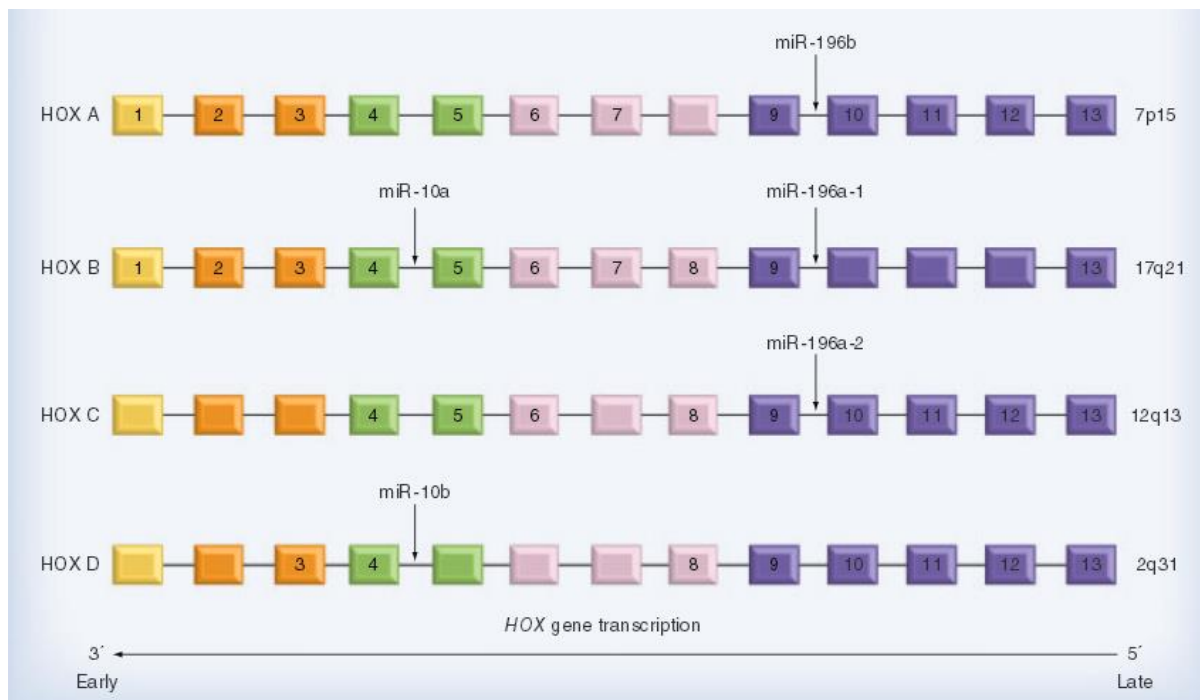


Figure 5: Structure de l'organisation des quatre loci HOX chez l'homme [10].

Les quatre groupes de gènes HOX sont localisés au niveau de quatre chromosomes différents. Les carrés non numérotés représentent les gènes perdus chez l'homme.

Les gènes HOX sont exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques ainsi qu'au niveau des progéniteurs hématopoïétiques. Les différents groupes de gènes HOX ont des profils d'expression spécifiques à chaque lignée hématopoïétique [11,12]. De ce fait, les gènes HOXA sont exprimés dans les cellules myéloïdes, les gènes HOXB dans les cellules érythrocytaires et les gènes HOXC dans les cellules lymphoïdes. Étonnamment, les gènes HOXD ne sont pas exprimés au cours de l'hématopoïèse, malgré le fait qu'ils aient des régions régulatrices similaires aux gènes des autres groupes [13].

De nombreuses études ont montré que les protéines HOX collaboraient avec des membres du groupe TALE (three-amino-acid loop extension), dont font partie les protéines des familles PBX et MEIS. Ces interactions sont de spécificité et d'affinité modérées en situation normale. Les protéines HOX des groupes 1 à 10 interagissent avec les protéines PBX, les protéines MEIS sont limitées aux protéines HOX des groupes 9 à 13 [14]. Les protéines HOX des groupes 9 et 10 peuvent interagir avec les protéines PBX et MEIS [10]. L'interaction entre les protéines PBX et HOX permet d'augmenter très significativement l'affinité et la spécificité des liaisons des protéines HOX à l'ADN. Dans la transformation leucémique, comme dans la régulation de la formation des tissus au cours de l'embryogénèse, une interaction a été établie entre les protéines HOX et les gènes TALE. [13].

1.4.2.2 Rôle des gènes HOX dans les LAM

De nombreuses études ont montré que les gènes HOX pouvaient promouvoir le développement de LAM ou de LAL en formant des fusions chimériques avec d'autres gènes (Figure 6) [15,16]. Récemment des études ont montré que leur niveau d'expression était également important pour le développement des LAM. Les gènes HOX peuvent être indirectement impliqués dans les LAM au travers de réarrangements chromosomiques impliquant leurs régulateurs en amont, tel que *MLL*. Normalement *MLL* régule positivement la transcription des gènes *HOX* en se liant à la région proximale de leur promoteur. Les protéines de fusion impliquant *MLL* activent la transcription des gènes *HOX* plus efficacement que *MLL* seul, et plus particulièrement, les membres de l'extrémité 5' du groupe *HOXA*; ceci notamment grâce à la présence de co-activateurs comme *MEIS1*. Ceci a pour conséquence de bloquer la différenciation myéloïde et d'activer la prolifération cellulaire [10].

gènes de fusion	chromosomes	maladies
GATA2-HOXA9	7p15	LAMK
NUP98-HOXA9	7p15	MDS, LAM, LMC
NUP98-HOXA11	7p15	MDS, LAM, LMC
NUP98-HOXA13	7p15	LAM
NIPBL-HOXB9	17q21	LAMK
NUP98-HOXC11	12q13	LAM
NUP98-HOXC13	12q13	LAM
NUP98-HOXD11	2q31	LAM
NUP98-HOXD13	2q31	LAM

Figure 6 : Gènes de fusion HOX.

La dérégulation de l'expression des gènes HOX a aussi été associée à la présence de mutations de la nucleophosmin 1 (NPM1). NPM1 est une protéine chaperonne qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme. Sa localisation prédominante se situe au niveau du noyau. Le déplacement de NPM1 à nouveau vers le cytoplasme intervient uniquement dans les LAM entraînant la sur-expression des gènes *HOX*. Alors que *HOXA4*, *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXB9* et *MEIS1* sont surexprimés aussi bien en présence de MLL et NPM1, les gènes *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXB5*, *HOXB6* et *HOXD4* sont surexprimés uniquement dans les LAM où NPM1 est cytoplasmique (muté). Le mécanisme exact de l'association entre la mutation de *NPM1* et la surexpression des gènes *HOX* reste peu clair. Une explication possible serait que *NPM1* perturbe directement l'expression des gènes *HOX*, ou bien que les mutations de *NPM1* bloquent la différenciation des premiers progéniteurs hématopoïétiques dans lesquels les gènes *HOX* sont surexprimés [10].

Chez l'adulte, les mutations de *NPM1* sont présentes dans environ 30% des cas de LAM *de novo*. Elles sont associées à un large éventail de sous-types cytologiques de LAM. On les trouve principalement dans les LAM avec caryotype normal et duplication en tandem interne de *FLT3* (*FLT3-ITD*). Ces leucémies n'expriment ni le CD34, ni le CD133/PROM1. Les profils d'expression génique des blastes de LAMs avec mutations de *NPM1* sont caractérisés par une signature moléculaire qui inclut une surexpression des gènes *HOX* et de *MEIS1*. Parmi les gènes *HOX* surexprimés dans les LAM avec *NPM1* muté, classiquement, neuf appartiennent au groupe des *HOXA*, et six au groupe des *HOXB*.

Debernardi et al. a évalué le niveau d'expression de quatre micro-ARNs connus pour cibler les gènes *HOX* ou pour être situés dans les groupes de gènes *HOX* (hsa-miR-181a, hsa-miR-10a, hsa-miR-10b et hsa-miR-196a) dans des LAM à caryotype normal. Pour trois de ces micro-ARNs, hsa-miR-10a, hsa-miR-10b et hsa-miR-196a, situés dans des régions intergéniques au sein des groupes *HOX*, leur niveau d'expression était significativement corrélé aux niveaux d'expression de la plupart des gènes *HOXA* et *HOXB* - sauf *HOXA1*, *HOXA13*, *HOXB1* et *HOXB13* -, et de *MEIS1* et *PBX3* [17]. Cammarata et al, étudiant l'expression spécifique des micro-ARNs dans les LAM ayant une mutation de *NPM1* et/ou une *FLT3-ITD*, a trouvé une signature de premier plan, consistant principalement en une surexpression de hsa-miR-10a, hsa-miR-10b, hsa-miR-196a et de hsa-miR-196b. [18].

1.4.2.3 La protéine MEIS1

MEIS1 est une protéine homéodomaine d'extension, qui joue un rôle majeur au cours de l'hématopoïèse normale, ainsi que durant la leucémogénèse des LAM. Dans l'hématopoïèse normale, l'expression de *MEIS1* diminue dans les cellules hématopoïétiques, d'autant plus qu'elles s'engagent dans une voie de différenciation [19]. Les membres de la famille MEIS peuvent former un hétéro-complexe stable avec les protéines PBX, de manière dépendante ou indépendante de l'ADN. De plus, l'interaction avec MEIS induit une localisation nucléaire des protéines PBX en empêchant leur export nucléaire. A noter que MEIS1 est un cofacteur commun à deux gènes divergents de la famille HOX, HOXA9 et HOXB3 [14]. *MEIS1* est fréquemment surexprimée chez les patients atteints de LAM.

2 LES LEUCÉMIES AIGÜES PROMYÉLOCYTAIRES

Les leucémies aiguës promyélocyaires (LAP) correspondent à un ensemble de LAM dont la caractéristique principale est l'accumulation, dans la moelle osseuse, de blastes bloqués dans leur processus de différenciation au stade promyélocytaire. Historiquement, les premières LAP ont été décrites en 1957 chez trois patients suédois par Hillestad. Celui-ci considérait cette entité comme la forme de LAM la plus agressive, associant envahissement sanguin par des promyélocytes et une prédisposition à des saignements sévères [20].

Cette maladie rare, qui représente environ 10 à 15% des LAM [20], est bien caractérisée sur le plan cytologique. Elle correspond à la LAM3 de la classification FAB, et font partie des leucémies à anomalies cytogénétiques récurrentes de bon pronostic selon la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS). Elles sont caractérisées par l'existence, dans plus de 95% des cas, de la translocation chromosomique réciproque et équilibrée $t(15;17)(q24;q21)$ conduisant à la juxtaposition du gène promyelocytic leukemia (*PML*), situé sur le chromosome 15, en 15q24.1, et du gène du récepteur α de l'acide rétinoïque (*RAR α*) situé sur le chromosome 17, en 17q21.2 [21-26]. Ce gène chimérique code la protéine de fusion PML-RAR α aux propriétés oncogéniques multiples.

Ce sous-type de LAM est caractérisé par une grande sensibilité à l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA) qui est un agent différenciant capable de restaurer jusqu'à son terme le programme de différenciation des granuleux chez ces patients [27].

2.1 SUR LE PLAN CLINIQUE

Les signes cliniques pouvant être mis en évidence chez les patients atteints de LAP, sont identiques à ceux pouvant être retrouvés chez les patients atteints d'autres LAM. L'accumulation de blastes dans d'autres organes, la leucostase et l'envahissement neuro-méningé sont rares dans les LAP. Il faut cependant noter que dans ces leucémies existe souvent au diagnostic un syndrome hémorragique diffus sévère, attribué par le Professeur Jean Bernard, en 1959, à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et à une hyperfibrinolyse [28]. La tendance aux saignements est augmentée par le relarguage de facteurs procoagulants par les blastes promyélocyaires dans la circulation, exacerbant la CIVD.

Historiquement, les LAPs ont été associées à un taux de mortalité élevé pendant la phase initiale de traitement. Celle-ci était le plus fréquemment attribuée à un syndrome hémorragique sévère et incontrôlé. En 1985, Cordonnier et *al.* observait ainsi des hémorragies cérébrales chez environ 40% des patients décédés de LAP. Par ailleurs, dans 15% des cas, les patients étaient décédés d'hémorragies localisées au niveau d'autres sites ou organes [29]. Depuis l'introduction de l'ATRA, les pourcentages de rémission complète obtenus sont de plus de 90% [30] et la survie à long-terme a largement augmenté, faisant des LAP une

maladie le plus souvent curable. Cependant la mortalité liée à l'induction, chez ces patients, demeure un problème significatif, les hémorragies étant souvent la cause de ces décès précoces.

2.2 SUR LE PLAN BIOLOGIQUE

2.2.1 *Sur le plan cytologique*

Le diagnostic de la LAP repose sur l'analyse de l'hémogramme, présentant des cytopénies plus ou moins franches, suite à l'envahissement médullaire et surtout celle du myélogramme où la blastose médullaire doit être au moins de 20% selon les critères de l'OMS. Deux formes de LAP ont été décrites par Bennett en 1980. La forme classique dite hypergranulaire (LAM3 selon la classification FAB) est caractérisée, le plus souvent, par une leuconéutropénie et des promyélocytes anormaux hypergranulaires. La taille et la forme du noyau des blastes sont irrégulières et très variables, avec souvent, néanmoins, un noyau réniforme ou bilobé. Le cytoplasme contient de nombreuses granulations azurophiles ainsi que de nombreux corps d'Auer en fagots (Figure 7A). La forme variante des LAP, dite hypogranulaire (LAM3 variante de la classification FAB), est le plus souvent diagnostiquée dans un contexte d'hyperleucocytose avec effondrement du temps de prothrombine et du fibrinogène sérique du fait d'une CIVD sévère. Les promyélocytes anormaux sont hypogranulaires, ne contiennent que de très rares corps d'Auer, et présentent un noyau le plus souvent bilobé, ce qui peut porter à confusion avec les leucémies aiguës monoblastiques (Figure 7B). Cette forme variante représente environ 15-20% des LAP. [31]

A noter que, selon les nouveaux critères de l'OMS, le diagnostic de LAP repose actuellement sur la mise en évidence des anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires caractéristiques de cette entité.

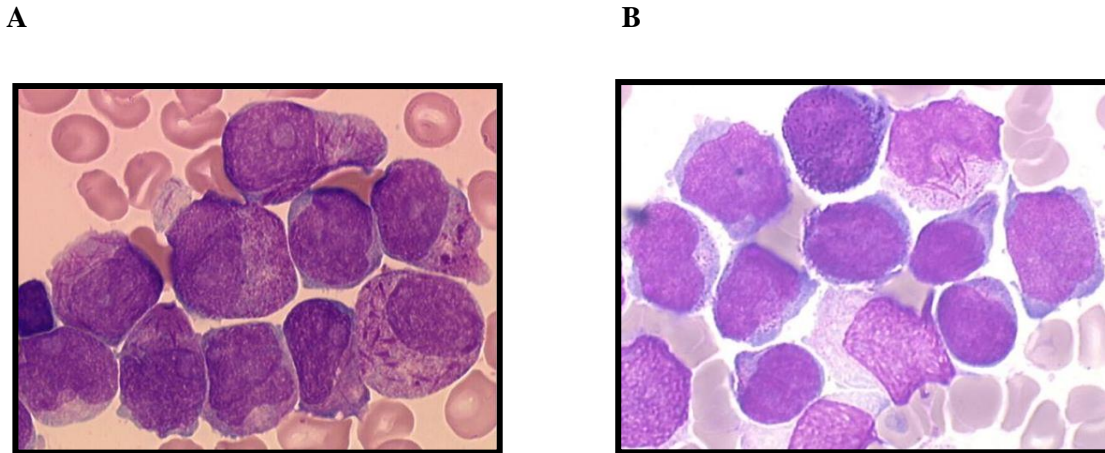


Figure 7: Frottis médullaires de patients atteints de LAP

(A) LAM3 classique dite hypergranulaire avec corps d'Auer en fagots; (B) LAM3 variante dite hypogranulaire avec rares corps d'Auer (http://www.med.univ-angers.fr/discipline/lab_hema/).

2.2.2 Sur le plan cytogénétique

Les LAP sont caractérisées par l'existence d'une translocation acquise, réciproque et équilibrée, la translocation $t(15;17)(q24;q21)$ (Figure 8). Celle-ci est retrouvée dans plus de 95% des cas [29]. Cette translocation aboutit à la juxtaposition du gène promyelocytic leukemia (*PML*) situé au niveau du bras long du chromosome 15, en 15q24.1, et du gène du récepteur α de l'acide rétinoïque (*RAR α*) localisé au niveau du bras long du chromosome 17, en 17q21.2 [22, 23]. Ce gène de fusion, *PML-RAR α* , aboutit à l'expression de la protéine de fusion PML-RAR α .

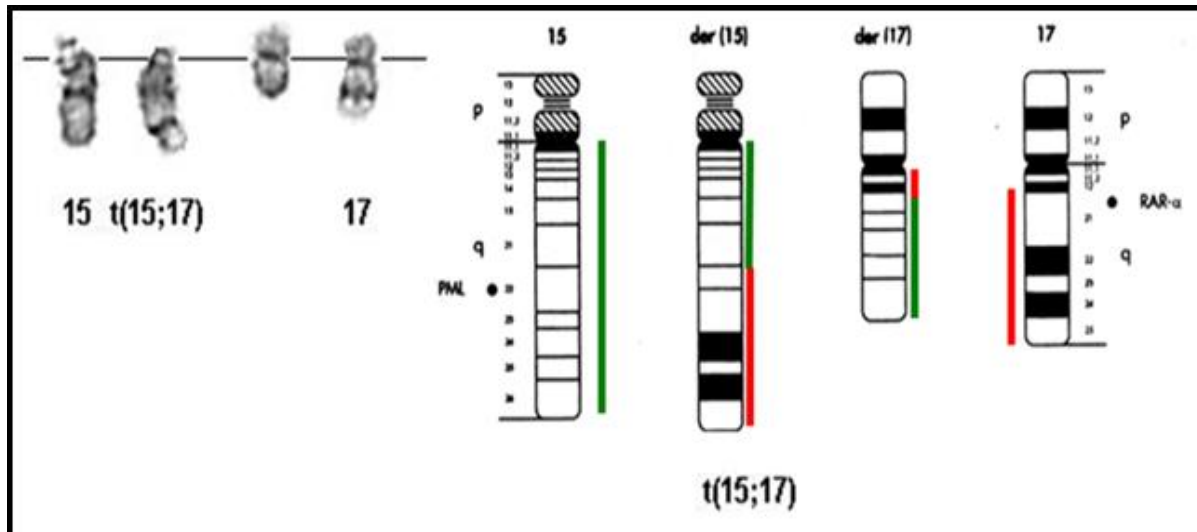


Figure 8: Représentation de la translocation réciproque équilibrée $t(15;17)(q24;q21)$ spécifique des LAP mettant en contact les gènes *PML* et *RAR α* . (D'après <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t1517ID1035.html>).

A noter que dans 25 à 40% des cas de LAP, des anomalies chromosomiques additionnelles sont mises en évidence. Les plus fréquentes sont la trisomie 8 et l'isochromosome 17q, dont leur valeur pronostique reste controversée [32].

Enfin, chez 5% des patients avec un diagnostic cytologique de LAP, si le gène chimérique inclus *RAR α* , son partenaire n'est pas *PML* mais, un autre gène, comme par exemple: *NPM1* [33], *NUMA* [34], *PLZF* [35] ou *STAT5B* [36] (Figure 9).

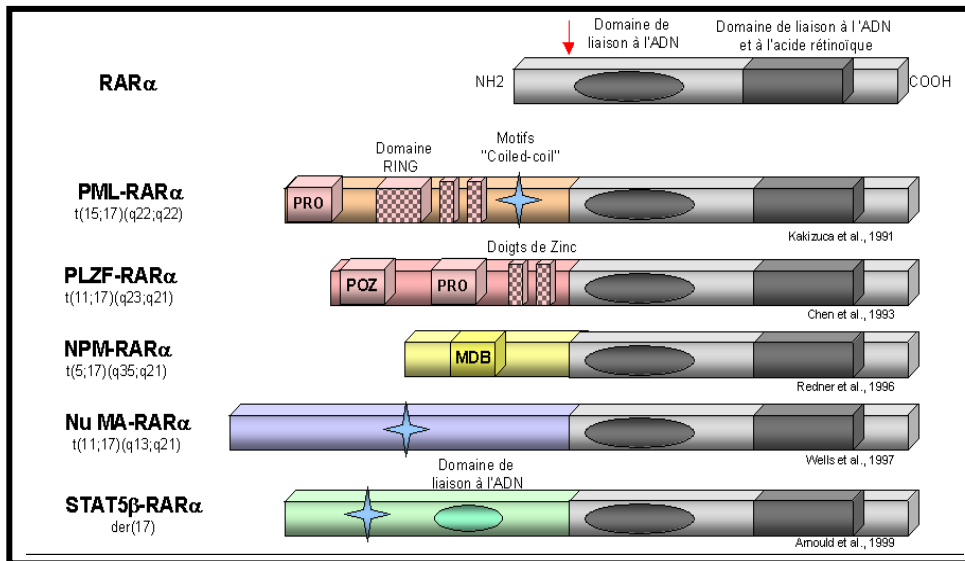


Figure 9: Représentation des différents partenaires de $RAR\alpha$ dans les LAP [21].

La flèche rouge positionne le point de cassure. $RAR\alpha$: Récepteur α de l'acide rétinoïque; PML: Promyelocytic leukemia; PLZF: Promyelocytic leukemia zinc finger; NPM1: Nucleophosmin 1; NUMA: Nuclear mitotic apparatus; PRO: motifs riche en proline; RING: domaine contenant des motifs en doigt de zinc; POZ: domaine de dimérisation; MDB: domaine de fusion aux microtubules.

2.2.3 Sur le plan moléculaire

Concernant le gène de fusion $PML-RAR\alpha$, il peut donner lieu à trois transcrits différents, appelés transcrits long (type L), variable (type V), et court (type S) (Figure 10). Alors que le point de cassure modifie invariablement le gène $RAR\alpha$ au niveau du second intron, le réarrangement du gène PML peut avoir lieu au niveau de trois points de cassure différents. Le point de cassure au niveau de l'intron 3 de PML produit un transcrit de fusion court (break cluster region 3 ou bcr3) qui joint l'exon 3 de PML et l'exon 3 de $RAR\alpha$. Le point de cassure au niveau de l'intron 6 de PML produit un transcrit de fusion long (bcr1) qui joint l'exon 6 de PML et l'exon 3 de $RAR\alpha$. Enfin, le point de cassure au niveau de l'exon 6 de PML , appelé bcr2, est associé à un transcrit de fusion de taille variable [37].

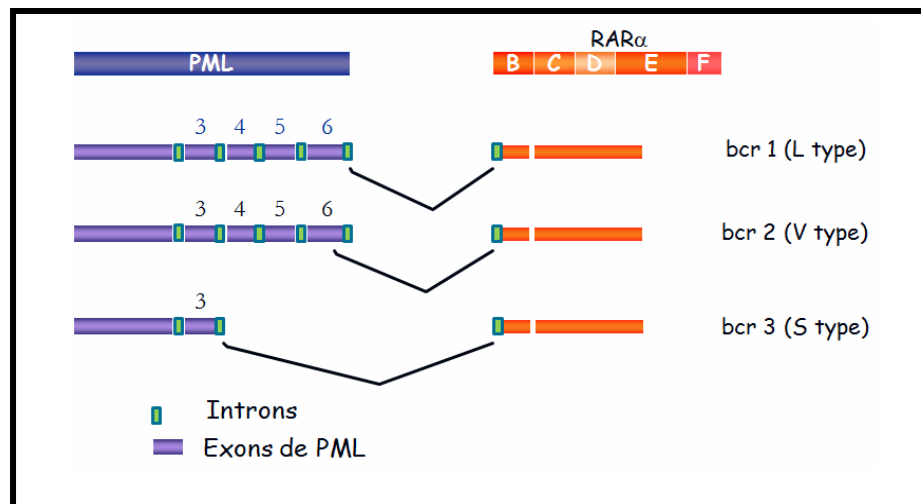


Figure 10: Représentation schématique des trois transcripts de *PML-RARα*.

RAR α : Récepteur α de l'acide rétinoïque; PML: Promyelocytic leukemia; bcr: break cluster region (D'après <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t1517ID1035.html>).

Par ailleurs, des mutations du gène *FLT3* sont fréquemment retrouvées chez les patients atteints de LAP. Le gène humain *FLT3*, localisé sur le chromosome 13, en 13q12, code un récepteur à activité tyrosine kinase de classe III. Ce récepteur est préférentiellement exprimé à la surface des progéniteurs hématopoïétiques. Lorsqu'il est activé par son ligand, FLT3 induit la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques primitifs. Il est retrouvé muté chez plus de 25% des patients atteints de LAM [38]. Dans les LAP, les mutations du gène *FLT3* de type duplication interne en tandem (*FLT3-ITD*) sont retrouvées chez 12 à 38% des patients [39]. Celle-ci correspond à la duplication d'une partie plus ou moins longue de la séquence codante, en tandem, au niveau de l'exon 14 ou de l'exon 15 codant le domaine juxtamembranaire. Celle-ci aboutit à la synthèse d'un récepteur activé de manière constitutive par autophosphorylation, provoquant la prolifération et la survie des blastes [40,41]. Dans les LAM, autres que les LAP, *FLT3-ITD* a une valeur pronostique péjorative majeure indiscutée [42]. Des associations entre le statut mutationnel de *FLT3*, les données clinico-biologiques au diagnostic et les caractéristiques moléculaires des LAP ont été mises en évidence par différents auteurs. Une méta-analyse a suggéré que la mutation *FLT3-ITD* était associée à la présence d'une hyperleucocytose au diagnostic et à une survie globale et sans leucémie plus courte chez les patients atteints de LAP [39]. Un lien entre hyperleucocytose au diagnostic, phénotype hypogranulaire (forme LAM3 variante), présence

d'un point de cassure de type *bcr3*, et la présence d'une mutation *FLT3-ITD* a été mis en évidence dans les LAP, avec un impact défavorable sur le plan pronostique [43,44].

2.2.4 Sur le plan immunophénotypique

L'immunophénotypage par cytométrie en flux est un complément utile au diagnostic des leucémies. Les promyélocytes leucémiques expriment de façon caractéristique les marqueurs myéloïdes CD13 et CD33, et sont classiquement négatifs pour le HLA-DR et le CD34 [45, 46]. L'expression, au niveau des promyélocytes leucémiques, des CD15 et CD65 - antigènes myéloïdes - est variable, tout comme celles du CD11b et du CD14 (marqueurs monocytaires). Le CD117 (c-kit), récepteur du stem cell factor, est le plus souvent exprimé par les blastes de LAP [46].

Différentes équipes ont montré qu'une expression élevée du CD34 était possible dans les LAP, et que celle-ci était fréquemment associée à une hyperleucocytose au diagnostic, à un phénotype microgranulaire, à la forme courte du transcrite de fusion (*bcr3*), et très souvent, à une expression aberrante du CD2 marqueur lymphoïde T [47-50]. Selon les modèles pronostiques réalisés, l'expression du CD34 et/ou du CD2 à la surface des blastes de LAP a été associée à un moins bon pronostic.

3 RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE DE LA TRANSCRIPTION

La programmation épigénétique est cruciale dans le développement des organismes et la stabilité des paramètres épigénétiques est essentielle pour le maintien des fonctions spécifiques des tissus et des différents types cellulaires [51]. Il n'est donc pas surprenant que la régulation épigénétique des gènes se caractérise globalement par un haut degré d'intégrité et de stabilité [51]. Il existe trois principaux mécanismes de régulation épigénétique: la méthylation de l'ADN au niveau des cytosines, les modifications d'histones au niveau de leur queue, et l'empreinte génomique [52].

3.1 LA MÉTHYLATION DE L'ADN

La méthylation de l'ADN reste le mécanisme épigénétique le plus étudié. La méthylation par les DNA méthyltransférases (DNMT) des résidus cytosine en position 5 au sein des dinucléotides CpG s'est développée relativement tard au cours de l'évolution. La méthylation de l'ADN est généralement considérée comme facilitant l'inactivation des gènes, à long terme, et assurant la stabilité du génome par la répression de transposons, rétrotransposons et d'éléments d'ADN répétitifs. Les dinucléotides CpG sont statistiquement sous-représentés dans le génome humain, probablement car la méthylation des cytosines les rend plus sensibles à la désamination. Cependant, il existe des zones, appelées îlots CpG, où l'on observe une forte densité de ces dinucléotides CpG. Les îlots CpG sont le plus souvent associés aux régions promotrices. On estime que 60% des gènes humains contiennent de tels îlots CpG [52].

Les profils de méthylations de l'ADN sont mis en place précocement durant l'embryogénèse, par l'intermédiaire d'au moins trois ADN méthyltransférases actives, DNMT1, DNMT3A et DNMT3B [40]. DNMT1 s'associe avec la fourche de réplication de l'ADN, et fonctionne comme une hémi-méthylase responsable du maintien des profils de méthylation lors la réplication de l'ADN [40]. DNMT3A et DNMT3B, qui sont des ADN méthyltransférases *de novo*, sont indispensables pour établir les profils de méthylation durant l'embryogénèse et les processus de différenciation cellulaire. Elles s'associent avec la fourche de réplication à la fin de la phase S [51].

3.2 LES MODIFICATIONS DES HISTONES

Les nucléosomes, qui sont l'unité de base de la chromatine, sont la cible principale des mécanismes de régulations épigénétiques, tant au niveau de leur composition que de leur arrangement [53]. Le nucléosome est constitué d'ADN enroulé sur deux tours autour d'un octamère d'histones composé de deux sous-unités de chacun des histones suivantes: H2A, H2B, H3 et H4 [51]. Entre le cœur des nucléosomes, l'histone de liaison H1 lie et augmente le compactage de l'ADN [51].

Introduction

Les modifications des histones, comprenant essentiellement acétylation, méthylation et phosphorylation, sont importantes dans la régulation transcriptionnelle. Un grand nombre d'entre elles sont maintenues de façon stable au cours de la division cellulaire. Les protéines qui interviennent dans ces modifications sont souvent associées au complexe qui régule la méthylation de l'ADN [54].

Les extrémités amino-terminales des histones, qui font saillie à l'extérieur du nucléosome, sont la cible privilégiée des modifications épigénétiques responsables de l'état transcriptionnel de la chromatine selon le « code histones » [53]. Si de nombreuses modifications covalentes ont été mises en évidence au niveau des histones, les plus étudiées sont aujourd'hui l'acétylation et la méthylation des résidus lysine. Le niveau d'acétylation est la résultante de l'activité de deux familles d'enzymes antagonistes: les histone-acétyltransférases (HAT) et les histone-désacétylases (HDAC). Elles coopèrent avec des complexes de remodelage de la chromatine en utilisant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour modifier l'accessibilité de l'ADN nucléosomique [53]. En désacétylant les résidus lysine, les HDAC permettent de passer d'une chromatine « permissive » pour la transcription à une chromatine « répressive », cet effet pouvant être renforcé par l'intervention ultérieure d'histone-méthyltransférases (HMT) ciblant les mêmes résidus (Figure 11) [53].

Si l'acétylation est clairement associée à l'activation transcriptionnelle et la désacétylation, à la répression, le rôle de la méthylation des queues d'histones est en revanche plus complexe. En effet, la conséquence fonctionnelle de cette modification épigénétique est variable selon la position concernée. Ainsi, par exemple, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est corrélée à une transcription active, tandis que celle de la lysine 9 sur la même histone est corrélée à une répression transcriptionnelle [53]. Un degré de complexité se rajoute à ce « code histones » concernant la méthylation des lysines, puisque celles-ci peuvent être mono-, di- ou triméthylées [53].

Des études ont établi une dépendance étroite et réciproque entre la méthylation des histones et celle de l'ADN: cette boucle de régulation permet de propager et de maintenir, de façon plus ou moins stable et localisée, une structure chromatinienne réprimée de type hétérochromatine au niveau des gènes [53].

Les modifications épigénétiques des histones, grâce à une série d'étapes étroitement dépendantes, permettent de passer d'une chromatine active sur le plan transcriptionnel à une chromatine fermée (répression transcriptionnelle), d'abord de façon réversible (acétylation/désacétylation), puis de façon plus stable (méthylation) [53].

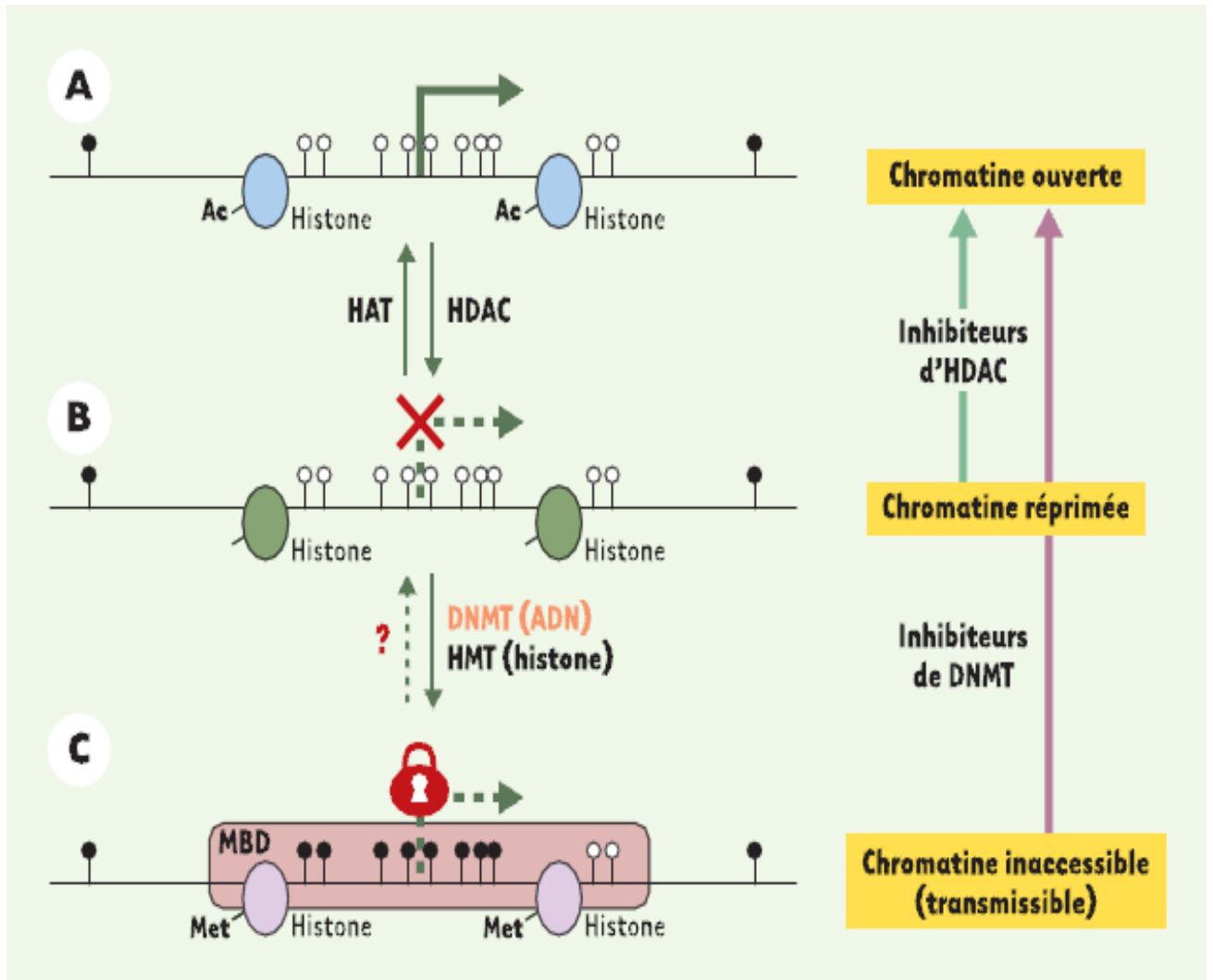


Figure 11: Modifications épigénétiques. [53]

La désacétylation des résidus lysine des histones par les HDAC (histone-désacétylases) permet de passer d'une chromatine « ouverte » (A), et accessible pour la transcription, à une chromatine « réprimée » (B), dans laquelle la transcription est inhibée. Néanmoins, une extinction génique transmissible lors de la mitose et/ou de la méiose est le résultat d'un « verrouillage » (C) encore plus important de la chromatine, caractérisé par: (1) la présence de modifications des histones, avec une désacétylation (par des HDAC) accompagnée d'une hyperméthylation par des HMT (histone-méthyltransférases) des résidus lysines; (2) une méthylation des îlots CpG par des DNMT (méthyltransférases de l'ADN); et (3) la fixation de protéines à MBD (methyl CpG binding domain) sur les CpG méthylés. (Histone-acétyltransférases, HAT).

3.3 L'EMPREINTE GÉNOMIQUE

L'empreinte génomique parentale est un mécanisme essentiel du développement chez les mammifères, par lequel certains loci sont réprimés pour un des deux allèles; ceci en fonction de son origine parentale. Les gènes soumis à l'empreinte parentale sont donc différents des autres gènes, puisqu'au maximum un seul des deux allèles est exprimé dans les cellules somatiques. A ce jour, plus de 50 gènes ont été identifiés comme étant soumis à l'empreinte parentale [54]. Ces gènes sont le plus souvent organisés en clusters plutôt que dispersés dans le génome. Ils sont situés dans des régions riches en CpG, ainsi que dans des régions présentant de nombreuses séquences répétées. Le processus d'empreinte consiste en une modification de la structure chromatinienne rendant impossible la lecture d'un domaine de l'ADN, parfois sur de grandes longueurs car il peut renfermer plusieurs gènes [54]. Cette modification de la structure chromatinienne fait intervenir les processus de méthylation de l'ADN, ou d'acétylation/désacétylation des histones à proximité de ces gènes [54]. Les domaines chromosomiques contenant des gènes soumis à l'empreinte parentale ont une réplication mitotique asynchrone, l'allèle paternel se répliquant toujours le premier. Les gènes soumis à l'empreinte sont impliqués dans une série de processus capables d'affecter la différenciation cellulaire et la croissance de nombreux tissus ou organes [55]. Des éléments de contrôle, appelés DMR (Differentially Methylated Regions), ont été identifiés au niveau de la plupart des gènes soumis à l'empreinte, la méthylation de ces séquences contrôlant la transcription des gènes concernés [56].

3.3.1 La région *DLK1-DIO3*

Chez l'homme, la région génomique *DLK1-DIO3*, localisée sur le bras long du chromosome 14, en 14q32, contient les gènes paternels soumis à l'empreinte *DLK1*, *RTL1* et *DIO3*, ainsi que les gènes maternels soumis à l'empreinte *MEG3*, *MEG8*, *MEG9* et en anti-sens, *RTL1* (as*RTL1*) [57]. Cette région abrite aussi deux groupes de gènes codant de petits ARN nucléolaires ou sno-ARN (groupes *SNORD113* et *SNORD114*) localisés entre *MEG3* et *MEG9*, ainsi que 53 micro-ARN sur le brin sens, et un micro-ARN (*hsa-miR-1247*) sur le brin anti-sens. Cette région correspond à l'un des clusters de gènes soumis à l'empreinte les plus grands du génome humain. Un grand nombre de ces micro-ARN sont différenciellement

Introduction

exprimés dans divers processus pathologiques, y compris certains cancers [57]. Cette région a été l'objet d'importants changements au cours de l'évolution, l'un des plus majeurs étant l'acquisition de la région ICR (Imprinting Control Region) [57]. Dans la région DLK1-DIO3, comme dans la majorité des groupes de gènes soumis à l'empreinte, le rôle de la méthylation de l'ADN a été plus largement étudié que les modifications des histones; ceci du fait que la méthylation de l'ADN est essentielle pour le contrôle et le maintien de l'empreinte [55].

Près d'une centaine d'ARN non-codants (53 micro-ARN et 41 sno-ARN) sont localisés dans la région DLK1-DIO3. Ils sont organisés en deux pôles qui s'étendent sur plus de 200 kilobases. Il existe un intérêt croissant pour l'étude des micro-ARN de la région 14q32, car ils sont dérégulés dans de nombreuses maladies, et possèdent des propriétés oncogéniques. Ils sont aussi susceptibles d'être impliqués dans la régulation de l'empreinte en 14q32 [58]. A noter que dans la région DLK1-DIO3, tous les gènes non-codants sont exprimés uniquement à partir de l'allèle maternel. Plus particulièrement, les micro-ARN sont transcrits de manière coordonnée avec *MEG3* [58]. En revanche, les gènes codant des protéines, ont une expression à partir de l'allèle paternel. L'expression de ces gènes est sous le contrôle de trois régions différenciellement méthylées (DMR). La première régulation de l'empreinte est exercée par le DMR intergénique (IG-DMR) qui se trouve entre les gènes *DLK1* et *MEG3*, et qui fonctionne comme une région de contrôle de l'empreinte. Deux autres régions différenciellement méthylées, contribuant à la régulation des gènes soumis à l'empreinte, recouvrent le gène *DLK1* (DLK1-DMR), ainsi que le promoteur et le début du gène *MEG3* (MEG3-DMR). Ces deux DMR sont hyperméthylés après la transmission paternelle, et hypométhylés après la transmission maternelle dans les cellules somatiques [57]. La région MEG3-DMR inclut sept sites de liaisons putatifs (séquence CCCTC) pour le facteur CTCF qui est un élément clef de la répression transcriptionnelle exerçant sa fonction régulatrice par liaison à l'ADN non méthylé de manière allèle-spécifique [58].

Au cours de l'évolution, les gènes de la région DLK1-DIO3 ont acquis leur spécificité ainsi que d'importantes fonctions [57]. La protéine DLK1 est impliquée dans la voie de signalisation Notch et intervient dans la différenciation cellulaire de plusieurs tissus [57]. *RTL1*, localisé sur le brin opposé à *DLK1*, est un gène de type rétro-transposon. La protéine RTL1 est essentielle pour le développement normal du placenta et des tissus embryonnaires. A l'autre extrémité de cette région se trouve *DIO3* qui code la 3-iodothyronine deiodinase, dont la fonction principale est de protéger le développement des tissus d'un taux excessif

d'hormones thyroïdiennes [57]. La région en aval de *MEG3* inclut les sno-RNA des groupes SNORD113 et SNORD114. *MEG3* est le gène le plus fréquemment étudié dans cette région, cependant ses fonctions restent mal connues. Il exercerait des fonctions anti-prolifératives à travers les interactions avec p53 et MDM2, et également en régulant directement ou indirectement la phosphorylation de Rb [57] (Figure 12).

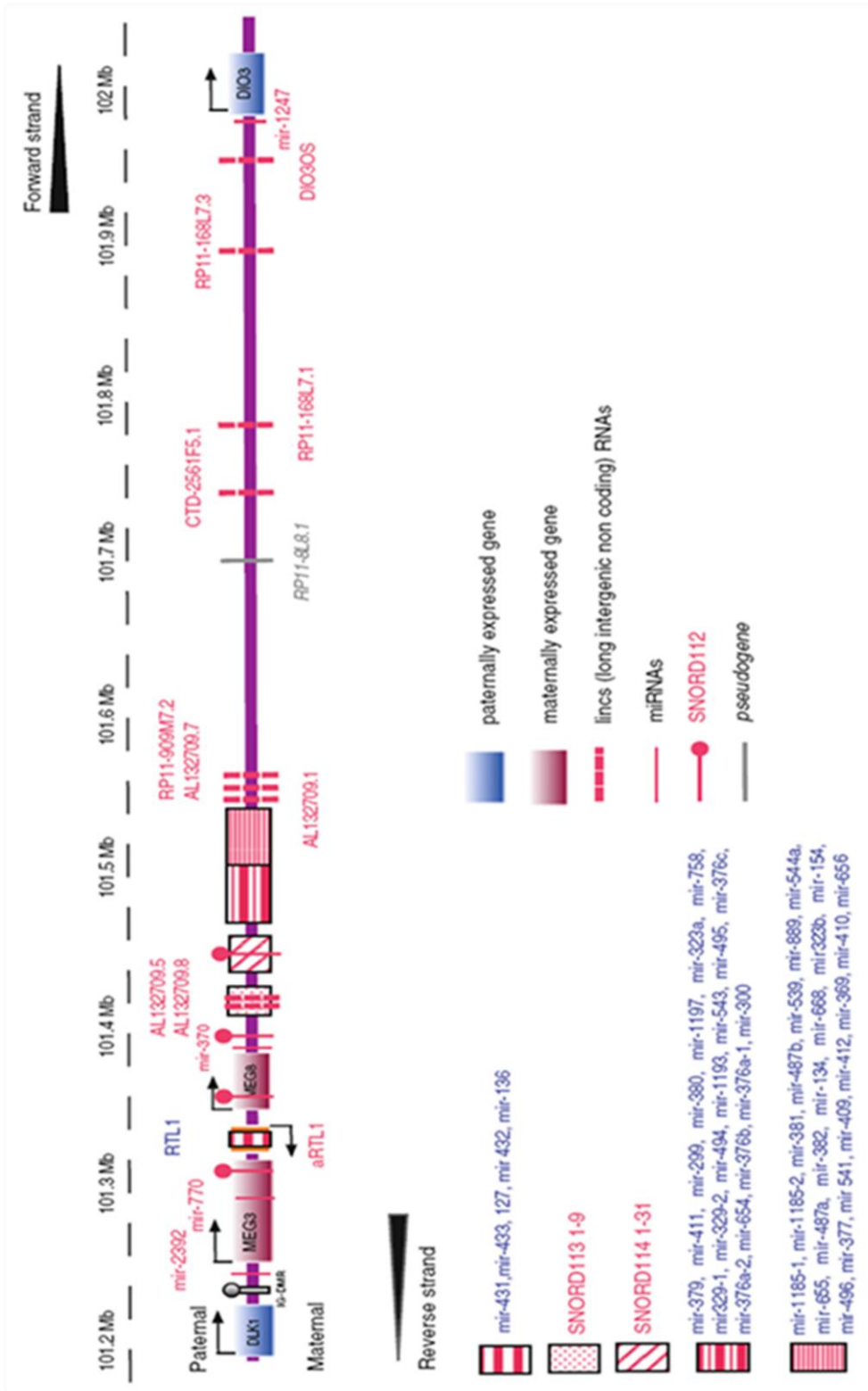


Figure 12: Représentation schématique de la région chromosomique DLK1-DIO3 dans les chromosomes paternels et maternels [57]

3.4 EPIGÉNÉTIQUE ET LAM

Dans les hémopathies malignes aiguës, les profils épigénétiques étudiés ont révélé des altérations de la méthylation et de l'hydroxyméthylation des cytosines au niveau de l'ADN, ainsi que des altérations de la méthylation et de l'acétylation des lysines des histones [59]. Dans les LAMs, les modifications des histones ont été associées à des mutations affectant des gènes régulateurs épigénétiques tel qu'*ASXL1*, ou à des surexpressions d'oncogènes spécifiques, tel que pour *EZH2* [60].

Dans environ 20% des LAM avec un caryotype normal, une mutation inactivatrice du gène codant l'ADN méthyltransférase 3A (*DNMT3A*) a été mise en évidence [60]. Dans la majorité des cas, ces mutations n'affectent qu'un seul des deux allèles de *DNMT3A*. Ces mutations de *DNMT3A* semblent perturber l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques normales dans des modèles murins KO. Par ailleurs, chez l'homme, elles ont été retrouvées dans des cellules à un stade pré-leucémique, leur conférant un avantage de prolifération par rapport aux cellules non-mutées. Il n'a pas été mis en évidence de trouble global de la méthylation des cytosines de l'ADN chez les patients ayant un mutant de *DNMT3A*. Cependant certaines zones préférentielles du génome pourraient être perturbées sur le plan de la méthylation, comme cela semblerait être le cas au niveau du locus *HOXA*. La valeur pronostique péjorative de ces mutations nécessite des études plus larges que celles réalisées jusqu'à présent, afin de savoir si celles-ci affectent le devenir des patients ayant une *FLT3*-ITD ou de ceux ayant un gène *FLT3* non muté [60]. Moins fréquentes sont les mutations d'*IDH1*, d'*IDH2* et de *TET2* dans les LAMs. Ces mutations entraînent toutes une modification très significative de l'ensemble du méthylome des blastes mutés, avec acquisition d'un état hyperméthylé global. Ces mutations ont aussi été associées à un pronostic défavorable.

Il faut garder à l'esprit que de nombreuses translocations ou inversions chromosomiques aboutissant à un gène de fusion et à une protéine chimérique perturbent le méthylome des blastes leucémiques. C'est par exemple le cas de la t(15:17) des LAP. En effet, dans ce sous-type de LAM, une interaction existe entre la protéine oncogénique de fusion PML-RAR α et la machinerie épigénétique [60]. Ainsi, PML-RAR α est responsable de la répression du gène RAR β 2 [60]. Au moins pour ce dernier, il a été montré que PML-RAR α pouvait recruter à la fois les ADN méthyltransférases et les histones déacétylases. Par ailleurs, le traitement des

cellules de LAP par de l'ATRA entraîne une déméthylation du promoteur de RAR β 2, la réexpression du gène, et la reprise du processus de différenciation cellulaire [60]. Une autre étude a montré le rôle clef des processus épigénétiques aberrants dirigés par PML-RAR α dans les LAP. Il a été ainsi montré que PML-RAR α contrôlait sélectivement l'expression de gènes lié à la leucémogénèse; ceci par un mécanisme qui dépendait de la modification des histones tel que la déacétylation de l'histone H3 et la triméthylation de la lysine en position 9 de l'histone H3 (H3K9me3) [60].

4 LES MICRO-ARN

4.1 GÉNÉRALITÉS

Les micro-ARN sont de courts ARN simple brin non-codants de 20 à 24 nucléotides de long, qui jouent un rôle clef dans la quasi-totalité des voies biologiques chez les mammifères et autres organismes multicellulaires [61]. Leur découverte, en 1990, a constitué l'une des avancées les plus importantes dans le domaine de la biologie [62,63]. On estime actuellement le nombre de micro-ARN entre 500 et 1000 dans le génome humain, soit 1 à 4 % de la totalité des gènes exprimés [64].

Les micro-ARN jouent un rôle clé dans de nombreux processus biologiques fondamentaux comme l'apoptose, la différenciation cellulaire, le métabolisme et le développement de certains tissus et organes [64]. Étant donné qu'un micro-ARN peut cibler plusieurs centaines d'ARN messagers (ARNm), l'expression des micro-ARN peut affecter une multitude de transcrits, et dérégler de nombreuses voies de signalisation [61].

4.2 BIOGÉNÈSE DES MICRO-ARN

Plus de la moitié des gènes codant pour des micro-ARN est localisée dans des régions dépourvues de gènes (régions intergéniques), chacun d'entre eux étant sous le contrôle d'un promoteur propre. Les gènes codants pour les micro-ARN sont habituellement transcrits par l'ARN polymérase II, dans le noyau de la cellule, sous la forme d'un long transcrit (> 1 kilobase) appelés pri-miRNA. Ces transcrits sont ensuite clivés par une RNase III de type endonucléase (ou DROSHA) et son co-facteur DGCR8 (PASHA), en un précurseurs de 70

nucléotides appelé pré-miRNA. Une fois exporté dans le cytoplasme, les pré-miRNA sont clivés par une autre RNase III nommée DICER en un duplex transitoire de 22 nucléotides [64]. Ce duplex sera ensuite incorporé dans le complexe protéique miRISC (miRNA associated multiprotein RNA-induced silencing complex) qui comprend notamment des protéines de la famille Argonaute (Ago) [65].

Après leur maturation achevée, trois possibilités s'offrent aux micro-ARN (Figure 13) [66]:

- retourner dans le noyau cellulaire où ils réprimeront la transcription de certains gènes.
- rester dans le cytoplasme où ils se lieront de manière parfaitement complémentaire à leur ARNm cible pour induire la répression ou la dégradation de ceux-ci.
- être sécrétés par les cellules via des exosomes ou liés à des protéines comme AGO2.

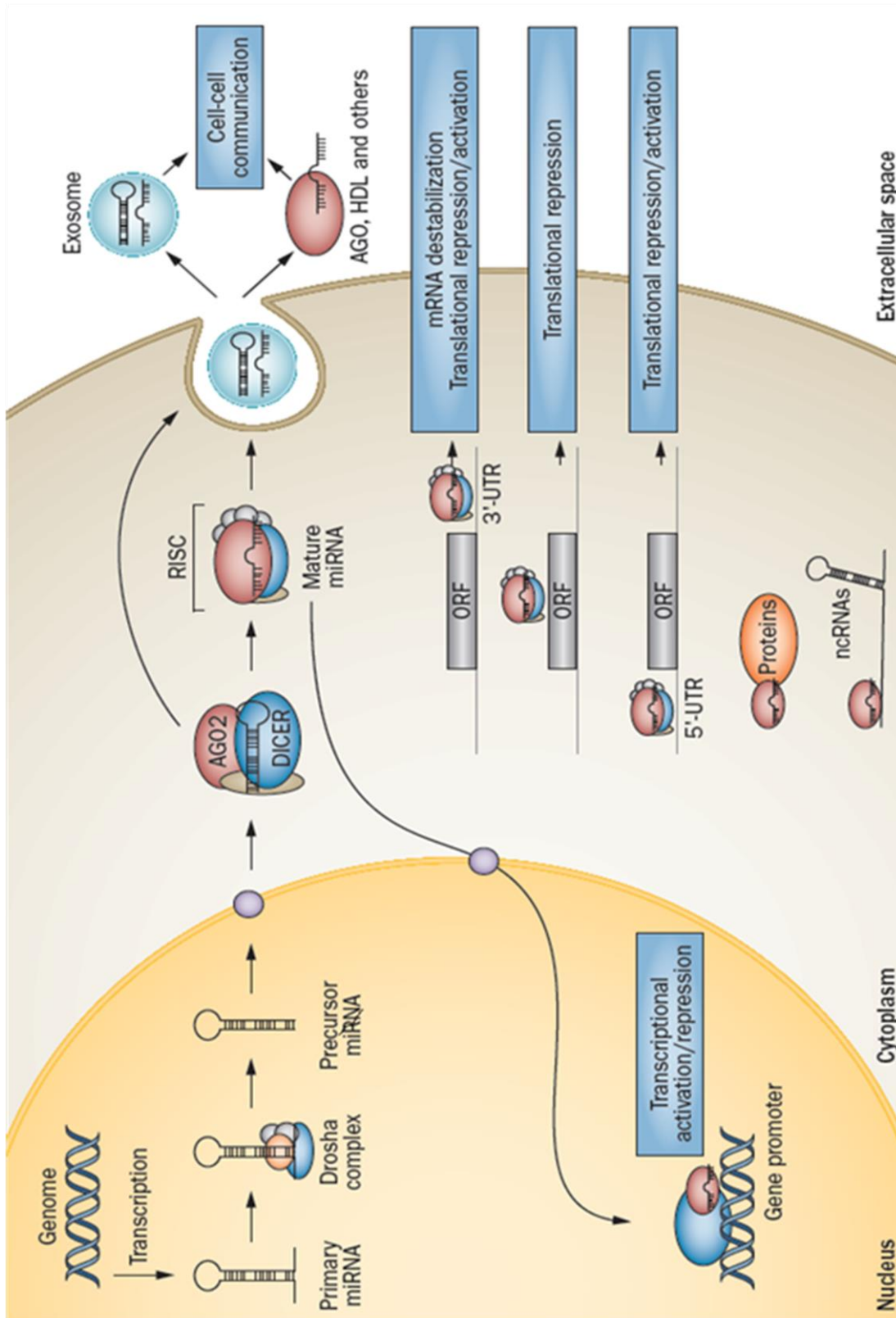


Figure 13: Biogénese des micro-ARNs [66].

4.3 LES MICRO-ARN CIRCULANTS

Actuellement, un intérêt tout particulier est porté aux micro-ARN circulants, car ceux-ci présentent de nombreux avantages liés à:

- leur spécificité: il a été mis en évidence des liens étroits entre micro-ARN circulants et leurs tissus d'origines [66].
- leur grande stabilité: quel que soit l'origine de l'échantillon (sérum, urine, salive, liquide séminal, etc...), les micro-ARN sont protégés de la dégradation par les RNases [67].
- leur facilité de détection et de quantification par microarrays ou PCR quantitative [68].

Certains micro-ARN sériques sont surexprimés exclusivement ou préférentiellement dans certaines formes de cancers. L'évaluation des niveaux d'expression des micro-ARN circulants, permet actuellement d'identifier des signatures micro-ARN ayant une fonction de biomarqueurs, et de prédire avec précision, le pronostic de différents types de cancers (Figure 14).

Introduction

Cancer type	n	microRNAs	Diagnosis	Prognosis	Source	Time point	Tumour stages
Lung cancer	400	miR-20a, miR-24, miR-25, miR-145, miR-152, miR-199-5p, miR-221, miR-222, miR-223, miR-320	Yes	No	Serum	Pre-operative	I-IV
Breast cancer	193	miR-200b	No	Yes	Plasma	Metastases	-
Ovarian cancer	96	miR-221	Yes	Yes	Serum	Pre-operative	I-IV
Cervical cancer	90	miR-218	Yes	No	Serum	Pre-operative	I-IV
Prostate cancer	84	miR-375, miR-141, miR-378*, miR-409-3p	Yes	No	Serum	Pre-operative	I-III
Renal cell cancer	90	miR-378, miR-451	Yes	No	Serum	Pre-operative	I-IV
Colorectal cancer	161	miR-409-3p, miR-7, miR-93	Yes	No	Plasma	Pre-operative	I-IV
Gastric cancer	164	miR-1, miR-20a, miR-27a, miR-34, miR-423-5p	Yes	No	Serum	Pre-operative	I-IV
Hepatocellular cancer	390	miR-122, miR-192, miR-21, miR-223, miR-26a, miR-27a, miR-801	Yes	No	Plasma	Pre-operative	I-IV
Pancreatic cancer	197	miR-21	No	Yes	Serum	Pre-operative	I-IV
Oesophageal cancer	290	miR-10a, miR-22, miR-100, miR-148b, miR-223, miR-133a, miR-127-3p	Yes	No	Serum	Pre-operative	I-IV
Head and neck cancer	50	miR-21	Yes	No	Plasma	Pre-/post-operative	I-IV
Thyroid cancer	106	let-7 e, miR-151-5p, miR-222	Yes	No	Serum	Pre-operative	I-IV
Brain tumours	122	miR-15b*, miR-23a, miR-133a, miR-150*, miR-197, miR-497, miR-548b-5p	Yes	No	Serum	Pre-operative	III-IV
Melanoma	94	miR-221	Yes	Yes	Serum	Pre-/post-operative	II-IV
Myelodysplasia	50	let-7a, miR-16	No	Yes	Plasma	-	I-II
Lymphoma	79	miR-221	Yes	Yes	Plasma	-	I-IV
Leukaemia	228	miR-155	No	Yes	Plasma/vesicles	-	I-IV

Figure 14: Valeur diagnostique et pronostique des micro-ARN circulants [66].

Par ailleurs, les micro-ARNs circulants semblent être des marqueurs prédictifs de la réponse thérapeutique dans différents cancers (Figure 15).

Cancer type	n	miRNAs	Methods	Source	Time point	Clinical stage	Drug	Result
NSCLC	260	miR-125b	RT-PCR	Serum	Before therapy	Stages III and IV	Cisplatin-based	MIR-125b was highly expressed in non-responsive patients
Breast cancer (HER2+)	27	miR-210	RT-PCR	Plasma	Before and after therapy	Stages I, II and III	Trastuzumab plus chemotherapy	Plasma levels of miR-210 were significantly higher in patients with residual disease than in patients with CR
Breast cancer	29	miR-155	RT-PCR	Serum	Before and after therapy	All stages	FEC and others	Decreased level of miR-155 was associated with therapeutic response
NHL	126	miR-92a	RT-PCR microarray	Plasma	Before and after therapy	All stages	CHOP-based	The low plasma levels of miR-92a were associated with relapsed disease
NSCLC	35	miR-21	RT-PCR	Plasma	Before therapy	Stages IIIB and IV	Cisplatin or carboplatin-based	Plasma levels of miR-21 were higher in samples from patients with PD and SD than in PR samples
Pancreatic cancer	177	miR-21	RT-PCR	Serum	Before therapy	Stages III and IV	Gemcitabine-based	High levels of miR-21 were correlated with a shortened time-to-progression and lower overall survival
Breast cancer	26	miR-125b	RT-PCR	Serum	Before therapy	Stages II and III	FEC based	MIR-125b was highly expressed in non-responsive patients
ESCC	64	miR-200c	RT-PCR	Serum	Before therapy	Stages II, III and IV	ACF or DCF	High expression of miR-200c correlated with poor response to chemotherapy

Abbreviations: ACF, adriamycin, cisplatin and 5-fluorouracil; CHOP, cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin, vincristine, and prednisone; CR, complete response; DCF, docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil; ESCC, oesophageal squamous cell carcinoma; FEC, 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide; NHL, non-Hodgkin lymphoma; NSCLC, non-small-cell lung cancer; PD, progressive disease; PR, partial response; RT-PCR, reverse transcription PCR; SD, stable disease.

Figure 15: Les micro-ARN circulants, des marqueurs prédictifs de la réponse thérapeutique [66].

4.4 MICRO-ARN ET LAM

Les micro-ARN jouent un rôle majeur dans les processus biologiques fondamentaux comme l'apoptose ou la différenciation cellulaire. Ils sont, de ce fait, impliqués de manière déterminante dans l'hématopoïèse, généralement comme régulateurs négatifs des gènes clef impliqués dans la différenciation [67]. Dans les LAM, les profils d'expression des micro-ARN reflètent en partie des mécanismes de transformation propres à chaque type leucémique [67].

Le premier profil d'expression des micro-ARNs dans les LAM a été réalisé par Mi et al, par comparaison aux LAL. Parmi les micro-ARNs différentiellement exprimés, mir-128b était surexprimé dans les LAL, alors que mir-223 l'était dans les LAM [69]. Dans les LAM avec t(8;21), il a été montré que mir-146a était surexprimé, alors que mir-133a était faiblement exprimé dans celles-ci. Pareillement, il a été montré que les micro-ARN mir-99a, mir-100 et mir-224 étaient surexprimés dans les LAM avec inv(16) [70]. De plus, dans les LAM avec un

Introduction

réarrangement de *MLL*, des micro-ARNs ont été identifiés comme mir-15a (ayant pour cible *BCL2*), mir-29 et mir-196 (ayant pour cible *HOXA7*, *HOXA8*, *HOXB8*, *HOXD8*) [70]. Enfin, dans les LAM avec mutation de *NPM1* il a été décrit une surexpression des micro-ARN de la famille de mir-10 [71] (Figure 16).

Genetic alteration	Highlighted upregulated miRs	Highlighted downregulated miRs
t(8;21)	miR-126, miR-126* miR-146a	miR-133a
inv(16)	miR-126, miR-126* miR-99a, miR-100 and miR-224	
t(15;17)	miR-127, miR-134, miR-323, miR-376a and miR-382 miR-127, miR-154, miR-154*, miR-299, miR- 323, miR-368, miR-370 miR-368, miR-382	
MLL rearrangements	miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a and miR-92	miR-10a, miR-331, miR-340 let-7, miR-15a, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-34b and miR-196a
NPM1 mutation	miR-10a, miR-10b miR-10a, miR-10b miR-10a, miR-10b	
CEBPA mutation	miR-181a, miR-181a*, miR-181b, miR-181c and miR-181d	
High MN1	miR-126, miR-126*, miR-129-5p, miR-130b and miR-424	miR-16, miR-19a, miR-20a, miR-100 and miR-196a
FLT3-ITD	miR-10a, miR-10b and miR-155	

Figure 16: Corrélation entre altérations génétiques et le micro-ARN dans les LAM [70].

Les micro-ARNs ne permettent pas seulement une caractérisation plus fine des différents sous-types de LAM. Ils peuvent également préciser le pronostic des patients atteints de LAM. Ainsi une forte expression des membres de la famille de *MIR181* est un facteur pronostic favorable pour les patients ayant une LAM à caryotype normal ou anormal [72,73]. Inversement, une forte expression de mir-155 et de mir-3151 constitue un facteur pronostic défavorable dans les LAM à caryotype normal [74].

Finalement les différentes études sur les micro-ARN dans les LAM ont permis d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques. Ainsi la protéine de fusion RUNX1/RUNX1T1, en se liant à des HDAC ou des DNMT, inhibe l'expression de mir-223. Un traitement combiné par un

agent déméthylant et des si-ARNs dirigés contre RUNX1/RUNX1T1 serait capable d'induire à nouveau l'expression de mir-223, et de restaurer la différenciation cellulaire [61].

4.4.1 *Mir-196b*

Les translocations chromosomiques impliquant le gène *MLL* (mixed lineage leukemia) produisent des protéines chimériques qui provoquent l'expression anormale d'un sous-ensemble de gène *HOX* et le développement de leucémies. Mir-196b est un micro-ARN « hématopoïétique » situé au sein du locus *HoxA*, entre *HOXA9* et *HOXA10*, au niveau du chromosome 7, en 7p15.2. Mir-196b est surexprimé dans les cellules souches hématopoïétiques peu différenciées par rapport aux cellules plus différenciées. Les protéines de fusion impliquant *MLL* provoquent la surexpression de mir-196b. Cette surexpression dans les progéniteurs hématopoïétiques médullaires entraîne une augmentation de la capacité de prolifération et de survie de ces cellules, contribuant ainsi au processus de leucémogénèse [75].

4.4.2 *Mir-10a*

Mir-10a est un micro-ARN « hématopoïétique » situé au sein du locus *HoxB*, entre *HOXB4* et *HOXB5*, au niveau du chromosome 17, en 17q21 [10]. Il a été montré que les patients atteints de LAM avec un caryotype normal et une mutation de *NPM1*, sont caractérisés par une signature de micro-ARN cellulaires spécifique. Ces patients ont en fait une surexpression de miR-10a-5p et miR-10b-5p. Cependant le rôle fonctionnel de ces deux micro-ARNs reste obscur dans ces LAM [71].

5 OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les LAM représentent un ensemble de pathologies dues à un pathologie clonale des cellules souches hématopoïétiques. Elles sont caractérisées par un arrêt de la différenciation hématopoïétique conduisant à une accumulation médullaire de cellules hématopoïétiques immatures, appelés blastes, et à une réduction de la production de cellules hématopoïétiques matures normales [1].

Le caryotype des blastes leucémiques permet d'identifier trois groupes de pronostic distinct. Parmi les LAM à risque cytogénétique favorable, figurent les LAP, et les LAM avec *inv(16)* ou *t(8;21)*.

Comme énoncé précédemment, les micro-ARN ont la particularité d'être extrêmement stables au niveau des différents fluides de l'organisme, dont le sérum. Ils sont par ailleurs des acteurs clef de l'hématopoïèse normale et leucémique, certains comme *mir-125b* étant considérés comme de véritable oncogènes.

Les objectifs de cette thèse étaient:

- d'évaluer si une caractérisation pangénomique des micro-ARN sériques permettait de distinguer les 3 sous-types de LAM de risque cytogénétique favorable, entre elles ainsi que les LAMs à caryotype normal.
- d'identifier les mécanismes responsables de l'expression des micro-ARN identifiés, et notamment d'évaluer le rôle de la régulation épigénétique via la méthylation de l'ADN.
- d'identifier des micro-ARN circulants spécifiquement surexprimés dans les LAM à caryotype normal par rapport à des volontaires sains ; ceci pour une utilisation ultérieure comme marqueurs de suivi de maladie résiduelle; et pour mieux préciser leur éventuel apport pronostic dans ce sous-groupe de LAM.

A microscopic view of numerous red blood cells, appearing as biconcave discs with a reddish-pink hue, set against a dark background. The cells are densely packed and vary in focus, creating a sense of depth.

RÉSULTATS

Serum expression profiling of microRNAs in acute myeloid leukemias (AMLs): from a specific acute promyelocytic leukemia signature to the combined deregulation of HOX loci and TALE genes in normal karyotype AMLs

Estelle Pedrono^{1,2}, Aline Schmidt-Tanguy^{2,3}, Anne Bouvier⁴, Diane Raingeard de la Blétière¹, Odile Blanchet^{2,5}, Anne Coutolleau¹, Nicole Piard⁶, Franck Geneviève⁴, Laurence Baranger⁷, Mathilde Hunault-Berger^{2,3}, Marc Zandecki⁴, Yves Delneste², Norbert Ifrah^{2,3} and Philippe Guardiola^{1,2}

¹ Plateforme SNP, Transcriptome & Epigénomique, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

² Unité Mixte de Recherche 892 INSERM - 6299 CNRS et Université d'Angers, Angers, France

³ Service des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

⁴ Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

⁵ Centre de Ressources Biologiques - Tumorotheque BB-0033-00038, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

⁶ Etablissement Français du Sang des Pays de la Loire, Angers, France

⁷ Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

EP and AST contributed equally to this manuscript.

Email address of each author: Estelle Pedrono: Estelle.Pedrono@etud.univ-angers.fr; Aline Schmidt-Tanguy: AlSchmidt@chu-angers.fr; Anne Bouvier: Anne.BouvierBio@chu-angers.fr; Diane Raingeard de la Blétière: Diane.Lambert@chu-angers.fr; Odile Blanchet: OdBlanchet@chu-angers.fr; Anne Coutolleau: AnCoutolleau@chu-angers.fr; Nicole Piard: Nicole.Piard@efs.sante.fr; Franck Geneviève: FrGenevieve@chu-angers.fr; Laurence Baranger: LaBaranger@chu-angers.fr; Mathilde Hunault-Berger: MaHunault@chu-angers.fr; Marc Zandecki: MaZandecki@chu-angers.fr; Yves Delneste: Yves.Delneste@univ-angers.fr; Norbert Ifrah: NoIfrah@chu-angers.fr; Philippe Guardiola: Phguardiol@aol.com.

Corresponding author: Philippe Guardiola, Plateforme SNP, Transcriptome & Epigénomique, Institut de Biologie en Santé, Centre Hospitalier Universitaire, 4 rue Larrey, 49100, Angers, France. Phone number: +33 2 41 35 40 24. Fax number: +33 2 41 35 45 82. Email address: phguardiol@aol.com

Short title: Serum microRNA profiling in AMLs

Section: Brief Communication

Word count abstract: 300

Word count text: 2380

Figure count: 4

ABSTRACT

This study, involving 47 acute myeloid leukemia (AML) patients, addressed whether serum-derived microRNAs expression profiles could identify each favorable cytogenetic risk AML subtype, i.e., acute promyelocytic leukemia (APL) and AMLs with either *inv(16)* or *t(8;21)*, as well as normal karyotype AMLs (NK-AMLs). APL patients had a specific signature with an overexpression of microRNAs located within the *DLK1-DIO3* imprinted region. Most of those microRNAs had expression levels correlated with known poor prognosis factors in APLs. Two microRNAs, hsa-miR-10a-3p and hsa-miR-196b-5p, of blast origin, were overexpressed in the serum of NK-AML patients with *NPM1* mutation and/or *FLT3-ITD*. Their high expression level was reflecting a larger deregulated expression of the *HOXA* and *HOXB* loci as well as of their cofactors *MEIS1* and *PBX3*. A member of the NKX family of homeodomain-containing transcription factors, *NKX2-3*, was also co-deregulated with those two microRNAs. In NK-AML patients, *NKX2-3* expression was significantly correlated to the one of *GFII*, which is involved in hematopoietic stem cell self-renewal, proliferation and differentiation. Hsa-miR-10a-3p and hsa-miR-196b-5p transcription, like the rest of the *HOXA* and *HOXB* loci as well as of *MEIS1*, *PBX3* and *NKX2-3* was epigenetically regulated via DNA methylation of CpG sites located close to the transcription starting sites of those genes. No overexpression of these two microRNAs as well as of the *HOX* and *TALE* genes described above and of *GFII* was observed in NK-AML patients with wild-type *FLT3* and *NPM1*. No DNA copy number variation within or surrounding the *HOXA* and *HOXB* loci as well as *MEIS1*, *PBX3*, *NKX2-3* or *GFII* was associated with the expression or methylation profiles of those genes. Further investigations are required to determine the mechanisms involved in the export of those microRNAs in AML patients' serum and whether a paracrine effect of those circulating microRNAs exists, which could contribute to the disease phenotype.

BACKGROUND

MicroRNAs are small (19 to 25 nucleotide long), highly conserved, non-coding RNA molecules that participate in post-transcriptional regulation of gene expression. These small non-coding RNAs are involved in most developmental processes, and as such, are critical regulators of the hematopoietic progenitor cell differentiation¹. In the field of leukemias, the consequences of their deregulated expression have led to consider some microRNAs as oncogenes, like miR-125b, and others as tumor suppressor genes^{1,2}.

Acute promyelocytic leukemia (APL), as well as acute myeloid leukemias (AML) with either translocation $t(8;21)(q22;q22)$ [t(8;21)-AMLs] or inversion $inv(16)(p13q22)$ / $t(16;16)(p13;q22)$ [inv(16)-AMLs], are considered as favorable cytogenetic risk AMLs. They are characterized by specific chromosomal alterations and fusion genes: *PML/RAR-alpha* fusion gene with reciprocal translocation $t(15;17)(q24;q21)$ for APLs, *AML1/ETO* (also called *RUNX1/RUNX1T1*) fusion gene for t(8;21)-AMLs, and *CBFB/MYH11* fusion gene for AMLs with either $inv(16)(q21;q22)$ or balanced reciprocal translocation $t(16;16)(q21;q22)$. Genomewide analyses have shown that these favorable cytogenetic risk AMLs could be accurately identified based on specific messenger RNA or DNA methylation profiles³⁻⁵.

Serum microRNAs are highly stable, and *per se* are considered as blood-based biomarkers for the detection and surveillance of several malignancies⁶⁻⁷. Encapsulation into vesicles (microvesicles or exosomes), or association with protective molecules such as the Argonaute 2 complex (for circulating microRNAs found in a non-membrane bound form) are the main mechanisms proposed to explain how circulating microRNAs are protected from endogenous RNase activity and, thus, remain stable in serum^{8,9}.

This study was performed to address whether a microarray-based approach could identify serum-derived microRNAs expression profiles associated with each of the favorable cytogenetic risk AML subtypes, and whether it could bring new insights into the role of the identified microRNAs in those AML subtypes.

RESULTS AND DISCUSSION

A specific serum-derived signature of microRNAs located within the DLK1-DIO3 imprinted locus characterizes APL patients

Based on microarray-based profiles generated from 47 patients diagnosed with either APL (n=12), inv(16)-AML (n=9), t(8;21)-AML (n=8) or NK-AML (n=18), a one-way analysis of variance identified 104 serum microRNAs differentially expressed between these four AML subgroups. A hierarchical clustering analysis based on the serum expression levels of those 104 microRNAs showed that all but two of the APL samples clustered together, and that this APL cluster mainly resulted from the overexpression of 26 microRNAs located within the *DLK1-DIO3* imprinted region, in 14q32 (14q32miRs) (Figure 1). No such tight clusters were observed for the remaining AML subgroups at this q-value threshold. The two APL patients, UPN2 and UPN7, had samples characterized by low 14q32miR serum expression levels, and as a consequence, did not cluster with the other APL samples. Conversely, one NK-AML patient, UPN33 - and to a lesser extent, UPN34 -, was expressing high serum 14q32miRs levels, such as the ones observed in APL patients. Whatever the ANOVA-associated q-value threshold was set to, these results were stable: non-APL leukemic samples never clustered tightly together according to their cytogenetics and UPN2 as well as UPN7 remained clustered with the non-APL samples (Figure Suppl1). RQ-PCR assays focusing on four identified APL-specific 14q32miRs - hsa-miR-299-5p, hsa-miR-323-3p, hsa-miR-410 and hsa-miR-495 - confirmed their overexpression in the serum of APL patients - excepted for

UPN2 and UPN7 - (Figure Suppl2). A microarray-based analysis of simultaneously collected serum and marrow diagnostic samples from six APL patients, including UPN2 and UPN7, showed a significant correlation between cellular and serum levels for the 26 APL-specific 14q32miRs, supporting the fact that these serum microRNAs originated from the leukemic blasts (Figure Suppl3). It also confirmed that those 14q32miRs were expressed at significantly lower levels in UPN2 and UPN7 blasts (Figure Suppl4). Therefore, the present study extended to a larger number of microRNAs Dixon McIver et al report¹⁰, which showed that APL blasts specifically overexpressed 14q32miRs and added that, although originating from the leukemic blasts, 14q32miRs ectopic expression was also detectable in APL patients' serum. The already reported overexpression of *SNORD112-114* and *MEG3*, in APL blasts, supported a global deregulation of the *DLK1-DIO3* imprinted region in this AML subtype¹¹. However, it appeared here, that some "atypical" APL patients had no 14q32miRs overexpression - both at the serum and cellular levels -, whereas NK-AML patients could express 14q32miRs at levels similar to the ones observed in "classic" APL patients. These data suggested that a high expression level of 14q32miRs was not a constant and exclusive characteristic of APL patients, and that studying those atypical patients should bring new insights into the regulation of the *DLK1-DIO3* imprinted region. Whether the presence of those microRNAs in APL patients' serum was due to an active secretion by the leukemic cells or resulted from a blasts' lysis warrants further investigations. Focusing on APL patients and the main biological characteristics known to be associated with a worse early outcome in this AML subtype, 12 of the 26 APL-specific 14q32miRs had serum expression levels significantly correlated with leukocytosis or prothrombin time at diagnosis, six of those microRNAs being significantly correlated with both covariates (Table Suppl2). *FLT3-ITD* and CD34 positivity of APL blasts were also associated with higher serum expression levels for eleven of those 26 microRNAs, including hsa-miR-299-5p and hsa-miR-323-3p (Table Suppl2). Interestingly, in mouse

models, the activation of the Dlk1-Dio3 region has been correlated with stem cells pluripotency¹²; while in hepatocarcinoma, 14q32miRs expression has been associated with a stem-like signature and a worse outcome¹³. It has also been shown that hsa-miR-299-5p and hsa-miR-323-3p were regulating the activity of the polycomb repressive complex 2 in mouse embryonic stem cells¹⁴. Therefore, high 14q32miRs likely reflected a more immature and aggressive APL phenotype. It would also be of interest to determine whether a paracrine effect of those circulating microRNAs existed, as reported by Valadi et al.¹⁵, which could contribute, via an intercellular amplification loop, to the severity of the APL features observed at diagnosis or at relapse. If true, this could lead to develop new therapeutic strategies in APL patients with highly proliferative diseases, for whom the issue of the short-term prognosis is of concern. Finally, the prognostic value of 14q32miRs deregulated expression in APL patients, and especially of hsa-miR-299-5p and hsa-miR-323-3p, should be addressed on a larger group of patients followed in a prospective clinical trial and treated homogeneously.

Hsa-miR-10a-3p and hsa-miR-196b-5p are overexpressed in the serum of NK-AML patients with NPM1 mutation and/or FLT3 internal tandem duplication (ITD)

In a subsequent step, as a specific signature had been identified for APL patients, a second differential expression analysis was performed, based on a one-way analysis of variance in which this group of patients was not included. Three microRNAs - namely, hsa-miR-10a-3p, hsa-miR-196a and hsa-miR-196b-5p - were identified that enabled distinguishing NK-AML patients from those with inv(16)-AMLs or t(8;21)-AMLs (Figure Suppl5). However, according to the serum expression levels of those three microRNAs, NK-AML patients with wild-type *NPM1* and *FLT3* (n=3) clustered with inv(16)-AML and t(8;21)-AML patients. As a consequence, a third one-way analysis of variance was performed that included all AML

patients but the three NK-AML patients with wild-type *NPM1* and *FLT3* (n=15). With a stringent q-value threshold ($|R^2|>0.74$), six microRNAs were identified that enabled distinguishing the APL patients, the NK-AML patients with *NPM1* mutation and/or *FLT3*-ITD and the patients with either inv(16)-AML or t(8;21)-AML (Figure 2). Again, in these two analyses, no microRNA could separate inv(16)-AMLs from t(8;21)-AMLs. Among the six identified microRNAs, hsa-miR-10a-3p and hsa-miR-196b-5p were the two specifically overexpressed in the serum of NK-AML patients with *NPM1* mutation and/or *FLT3*-ITD. The serum expression levels of those two microRNAs in NK-AML patients were not significantly different between those with *NPM1* mutation alone, *FLT3*-ITD alone and with *both NPM1* mutation and *FLT3*-ITD (data not shown). These findings were in agreement with (1) Cammarata et al. study showing that, at the cellular level, both hsa-miR-10a-3p and hsa-miR-196b-5p were overexpressed in these three subgroups of NK-AMLs when compared to inv(16)-AMLs or t(8;21)-AMLs, without any differences according to *FLT3* and *NPM1* genotypes, as far as at least one of these two genes was mutated¹⁶, and (2) with Wang et al. study showing that hsa-miR-196b-5p was expressed at lower levels in APL cells¹⁷. A microarray-based analysis of simultaneously collected serum and marrow diagnostic samples from 10 of the 18 NK-AML patients, i.e., patients with at least 80 percent marrow blasts in their diagnostic sample, showed a significant correlation between cellular and serum expression levels for hsa-miR-10a-3p and hsa-miR-196b-5p (Figure Suppl6). These microarray-derived data on those two microRNAs were validated by RQ-PCR assays on the 35 non-APL leukemic patients (Figure Suppl7). Of note, whether considering the entire group of patients or excluding APL and/or inv(16)-AML and/or t(8;21)-AML patients, the serum expression level of those two microRNAs was not correlated to the leukocytosis at diagnosis (data not shown), suggesting that their presence in the serum of AML patients was not due to a blast lysis. Further investigations are required to delineate the mechanisms involved in the

extracellular export of microRNAs in AMLs, especially as *NPM1* has been identified as a protein involved in such process¹⁸. Interestingly, the serum expression levels of hsa-miR-196b-5p was significantly higher in NK-AML patients with *NPM1* mutation and/or *FLT3*-ITD than in a series of seven healthy volunteers (Figure Suppl8), suggesting that these two microRNAs could be the basis for minimal residual disease assessment (MRD). This serum-based approach would be particularly useful when no informative MRD marker is available or when a relapse is suspected but cannot be ruled out by standard cell-based assays, such as during unexplained and prolonged cytopenias.

The expression of hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10a-3p in NK-AMLs correlates with a deregulated transcriptional and DNA methylation program affecting HOX / TALE genes

A transcriptome analysis was subsequently performed on blast samples for 39 of the 47 AML patients (APLs, n=11; inv(16)-AMLs, n=8; t(8;21)-AMLs, n=6; NK-AMLs, n=14), i.e., those with at least 80 percent blasts at diagnosis. Linear regression analyses showed that serum expression levels of hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10a-3p were correlated to the cellular expression levels of most *HOXA* and *HOXB* genes as well as to the ones of *MEIS1*, *PBX3* and *NKX2-3* (Figure 3 - Table Suppl3). Similar findings were observed when considering the cellular expression levels of those two microRNAs instead of their serum's ones (Table Suppl3). Schotte et al., then de Oliveira et al., have shown that hsa-miR-196b-5p was overexpressed in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias as well as in some T-cell acute lymphoblastic leukemias, i.e., leukemias in which *HOXA* genes are known to be deregulated^{19,20}. The present study extended these reports, showing that, in NK-AMLs with *NPM1* mutation and/or *FLT3*-ITD, hsa-miR-196b-5p overexpression was associated with a transcriptional activation of the *HOXA* locus that includes this microRNA, as well as of the *HOXB* locus that includes hsa-miR-10a-3p. Thus, this study showed that, in NK-AMLs, hsa-miR-10a-3p and hsa-miR-196b-5p appeared to be coordinated and due to a

synchronized deregulation of the HOXA and HOXB loci. Furthermore, the expression levels of *MEIS1* and *PBX3*, which are also important cofactors of HOX genes^{21,22}, were linked to hsa-miR-10a-3p and hsa-miR-196b-5p overexpression in those patients. This study suggested a central role to *MEIS1*, as it encodes a critical cofactor of HOXA9 and HOXB3²³, i.e., the two closest HOX genes with respect to the location of hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10a-3p on chromosomes 7 and 17, respectively. Of note, no DNA copy number variations were identified by SNP-arrays within or surrounding the HOXA and HOXB loci, *MEIS1*, *PBX3* or *NKX2-3* (data not shown). With respect to *NKX2-3*, a gene encoding a member of the NKX family of homeodomain-containing transcription factors, its involvement during leukemogenesis or normal hematopoietic progenitor cell differentiation has never been reported. Its co-expression with hsa-miR-10a-3p and hsa-miR-196b-5p as well as with *MEIS1*, *PBX3* and most *HOXA* and *HOXB* genes supported a critical role for *NKX2-3* in NK-AMLs. The fact that *GFII*, a key transcription repressor involved in hematopoietic stem cell proliferation, differentiation and self-renewal^{24,25}, was the *NKX2-3* most correlated gene in term of expression levels (correlation coefficient, 0.83 - Figure Suppl9), also supported the hypothesis that *NKX2-3* was a key player in NK-AMLs. Interestingly, according to GRCh37/hg19 assembly, a high affinity binding site for NK-2 proteins (5' TTAAGTG 3') was located 3,740 bases upstream of the transcription starting site of *GFII* (NM_005263.3), at position 92,956,173, suggesting that *NKX2-3* transcription factor could directly interact with *GFII* promoter and influence its transcription. Of note, as for hsa-miR-10a-3p and hsa-miR-196b-5p, NK-AML patients with wild-type *NPM1* and *FLT3* were expressing most *HOXB2* to *HOXB6* genes as well as *MEIS1*, *NKX2-3*, *PBX3* and *GFII* at significantly lower levels when compared to the other NK-AML patients with *NPM1* mutation and/or *FLT3*-ITD (Figure Suppl10).

For 23 of the 39 AML patients - APLs, n=8; inv(16)-AMLs, n=2; t(8:21)-AMLs, n=2; NK-AMLs, n=11) who had a diagnostic DNA sample available with at least 80 percent blasts, a bone marrow methylome study was performed that focused on HOXA and HOXB loci as well as on *MEIS1*, *PBX3*, and *NKX2-3*. Regarding NK-AML patients, the methylation level of the CpG sites within HOXA and HOXB loci varied according to the considered HOX gene, but also for a given HOX gene, from one patient to the other such as for *HOXA2*, *HOXA5* and *HOXA7* (Figure Suppl11). For *MEIS1*, *PBX3* and *NKX2-3*, the methylation patterns were similar from one NK-AML patient to the other, the promoter-associated CpG sites being hypomethylated in all cases. A linear regression analysis showed that the serum expression levels of hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10-3p were negatively correlated to the methylation status of the CpG sites close upstream or within these two microRNAs. In addition, the serum expression levels of hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10a-3p were negatively correlated to the methylation levels of CpG sites located close to the transcription starting sites of *HOXA1*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXA11*, *HOXA13*, *HOXB2*, *HOXB4*, *HOXB5*, *HOXB6*, *HOXB7*, *HOXB8*, *HOXB9* and *HOXB13*, as well as of *MEIS1* and *NKX2-3* - i.e., within the 5'UTR or the first 200 base pairs upstream of the transcription starting site of those genes - (Figure 4 - Table Suppl4). Similar results were obtained when considering cellular expression levels of hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10a-3p (Table Suppl4). These data suggested that, in AMLs, the expression of hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10a-3p was epigenetically regulated via DNA methylation, as were the other genes belonging to the HOXA and HOXB loci, *MEIS1*, *PBX3* and *NKX2-3*. Thus, this study identified, in NK-AMLs, a coordinated DNA methylation and transcriptional program between HOXA and HOXB loci - including hsa-miR-10-3p and hsa-miR-196b-5p - and the TALE genes, *MEIS1*, *PBX3* and *NKX2-3*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Association Laurette Fugain (PhG), from the Cancéropôle Grand Ouest (PhG) and from the Ligue Contre le Cancer / Comité Départemental 49 (PhG and OB).

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

PhG was the principal investigator and takes primary responsibility for the paper.

EP, AST, AB, DRB, AC, and PhG contribute to the conception of design.

EP, AST, AB, DRB, OB, AC, NP, FG, LB, MHB, MZ, NI, and PhG contribute to the collection and assembly of data.

EP, AST, AB, DRB, OB, YD, MZ, NI, and PhG contribute to the data analysis and interpretation.

EP, AST, DRB, and PhG contribute to manuscript writing.

EP, AST, AB, DRB, OB, AC, NP, FG, LB, MHB, MZ, YD, NI, and PhG contribute to the drafting of the article, revise it and approved the final version.

PhG coordinated the research.

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

The authors have nothing to disclose and declare no conflicts of interest or competing financial interests in relation to the work described in this manuscript.

REFERENCES

1. Alemdehy MF, Erkeland SJ. MicroRNAs: key players of normal and malignant myelopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2012;19:261-7.
2. Bousquet M, Harris MH, Zhou B, Lodish HF. MicroRNA miR-125b causes leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:21558-63.
3. Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, Beverloo HB, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Löwenberg B, Delwel R. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350:1617-28.

4. Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Döhner H, Pollack JR. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adulte acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350:1605-16.
5. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, van Putten W, Skrabanek L, Campagne F, Mazumdar M, Grealley JM, Valk PR, Löwenberg B, Delwel R, Melnick A. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2010;17:13-27.
6. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11:145-56.
7. Grasedieck S, Sorretino A, Langer C, Buske C, Döhner H, Mertens D, Kuchenbauer F. Circulating microRNAs in hematological diseases: principles, challenges, and perspectives. *Blood.* 2013;121:4977-84.
8. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute 2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:5003-8.
9. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011;13:423-33.
10. Dixon-Mclver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, Chaplin T, Andrew Lister T, Young BD, Debernardi S. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One.* 2008;3:e2141.
11. Valleron W, Laprevotte E, Gautier EF, Quelen C, Demur C, Delabesse E, Agirre X, Prósper F, Kiss T, Brousset P. Specific small nucleolar RNA expression profiles in acute leukemia. *Leukemia.* 2012;26:2052-60.

12. Liu L, Luo GZ, Yang W, Zhao X, Zheng Q, Lv Z, Li W, Wu HJ, Wang L, Wang XJ, Zhou Q. Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem*. 2010;285:19483-90.
13. Luk JM, Burchard J, Zhang C, Liu AM, Wong KF, Shek FH, Lee NP, Fan ST, Poon RT, Ivanovska I, Philippar U, Cleary MA, Buser CA, Shaw PM, Lee CN, Tenen DG, Dai H, Mao M. DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival. *J Biol Chem*. 2011;286:30706-13.
14. Zhang Y, Teng F, Luo GZ, Wang M, Tong M, Zhao X, Wang L, Wang XJ, Zhou Q. MicroRNA-323-3p regulates the activity of polycomb repressive complex 2 (PRC2) via targeting the mRNA of embryonic ectoderm development (Eed) gene in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2013;288:23659-65.
15. Valadi H Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*.2007;9:654-9.
16. Cammarata G, Augugliaro L, Salemi D, Agueli C, La Rosa M, Dagnino L, Civiletto G, Messina F, Marfia A, Bica MG, Cascio L, Florida PM, Mineo AM, Russo M, Fabbiano F, Santoro A. Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2010;85:331-9.
17. Wang Y, Li Z, He C, Wang D, Yuan X, Chen J, Jin J. MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44:191-7.
18. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:7248-59.
19. Schotte D, Chau JC, Sylvester G, Liu G, Chen C, van der Velden VH, Broekhuis MJ, Peters TC, Pieters R, den Boer ML. Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2009;23:313-22.
20. de Oliveira JC, Scrideli CA, Brassesco MS, Morales AG, Pezuk JA, Queiroz Rde P, Yunes JA, Brandalise SR, Tone LG. Differential miRNA expression in childhood acute

lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features. *Leuk Res.* 2012;36:293-8.

21. Nakaruma T, Largaespada DA, Shaughnessy JD Jr, Jenkins NA, Copeland NG. Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukemia. *Nat Genet.* 1996;12:149-53.

22. Li Z, Zhang Z, Li Y, Arnovitz S, Chen P, Huang H, Jiang X, Hong GM, Kunjamma RB, Ren H, He C, Wang CZ, Elkahloun AG, Valk PJ, Döhner K, Neilly MB, Bullinger L, Delwel R, Löwenberg B, Liu PP, Morgan R, Rowley JD, Yuan CS, Chen J. PBX3 is an important cofactor for HOXA9 in leukemogenesis. *Blood.* 2013;121:1422-31.

23. Thorsteinsdottir U, Kroon E, Jerome L, Blasi F, Sauvageau G. Defining roles of HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol.* 2001;21:224-34.

24. Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, Orkin SH. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature.* 2004;431:1002-7.

25. Zeng H, Yücel R, Kosan C, Klein-Hitpass L, Möröy T. Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 2004;23:4116-25.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Heatmap and 2-dimension hierarchical clustering analysis of 47 AML samples (APLs, n=12, inv(16)-AMLs, n=9; t(8;21)-AMLs, n=8; NK-AMLs, n=18) and 104 serum microRNAs identified through a multigroup comparison based on a one-way analysis of variance with a q-value threshold of 10^{-3} . The selection of this threshold was based on the fact that the cumulative percentage of explained variance was above 70 percent with the first three components of a principal component analysis based on those 103 microRNAs, i.e. 71 percent. Columns represent samples; rows represent microRNAs. The log₂ relative expression scale is depicted on the left.

Figure 2. Heatmap and 2-dimension hierarchical clustering analysis of 44 AML samples (APLs, n=12, inv(16)-AMLs, n=9; t(8;21)-AMLs, n=8; NK-AMLs, n=15) and six serum microRNAs identified through a multigroup comparison based on a one-way analysis of variance with a q-value threshold of 10^{-8} . With this threshold, the cumulative percentage of explained variance was 92 percent with the first three components of a principal component analysis based on those six microRNAs. Columns represent samples; rows represent microRNAs. The log₂ relative expression scale is depicted on the left.

Figure 3. Heatmap of the Pearson's correlation coefficients assessing the relationships of hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10-3p serum expression levels with the cellular expression level of the *HOXA* and *HOXB* genes as well as of *MEIS1*, *PBX3* and *NKX2-3* in 39 AML patients diagnosed with either APL (n=11), inv(16)-AML (n=8), t(8;21)-AML (n=6) or NK-AML (n=14). The coefficient values' scale is depicted on the right.

Figure 4. Heatmap representing the Pearson's correlation coefficients that assessed the relationships between hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10-3p serum expression levels and the

methylation level of the CpG sites located close to the transcription starting sites of the *HOXA* and *HOXB* genes as well as of *MEIS1*, *PBX3* and *NKX2-3* in 23 AML patients diagnosed with either APL (n=8), inv(16)-AML (n=2), t(8;21)-AML (n=2) or NK-AML (n=11). Scale of the Pearson's correlation coefficients is depicted on the top right.

Figure 1.

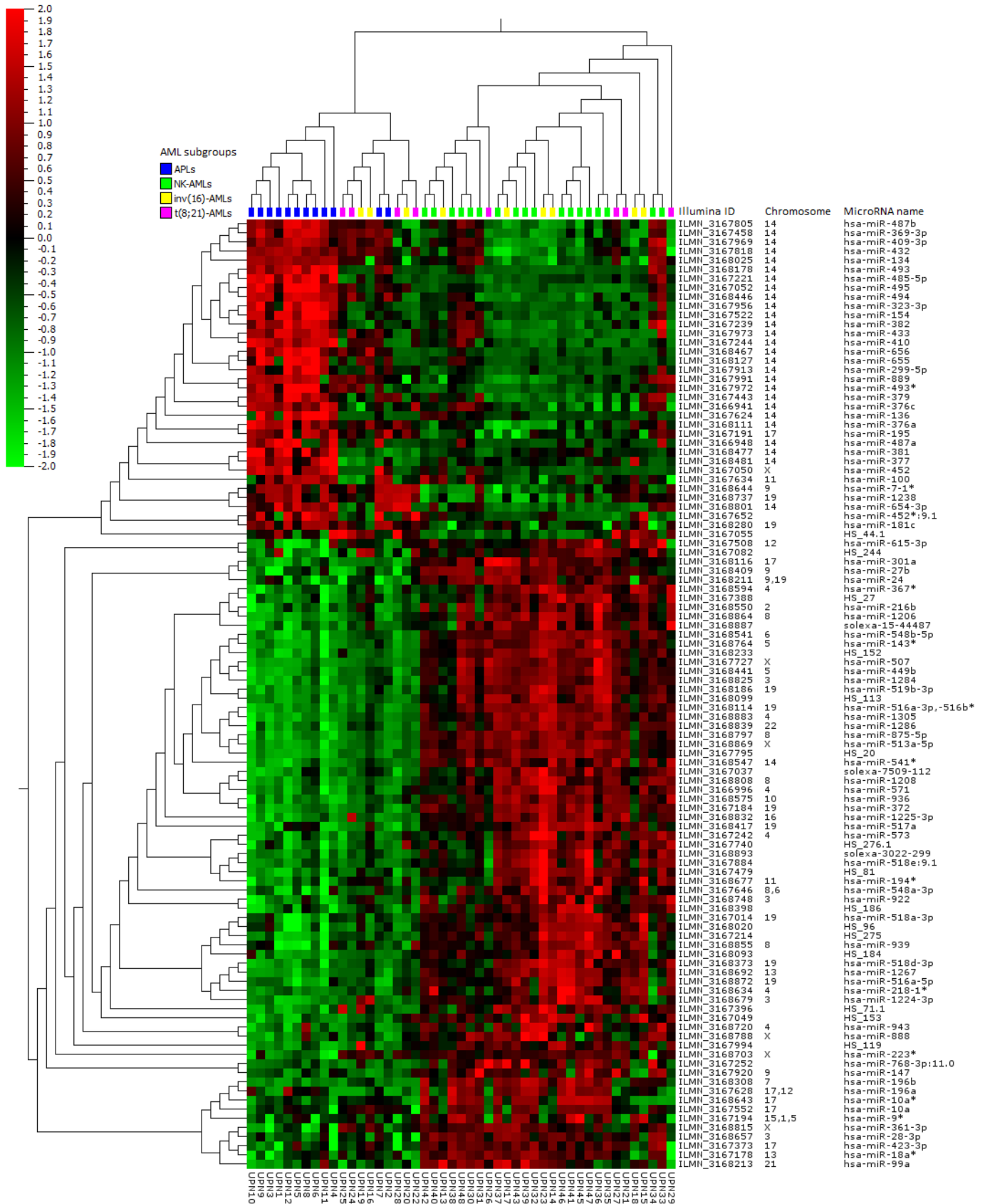


Figure 2.

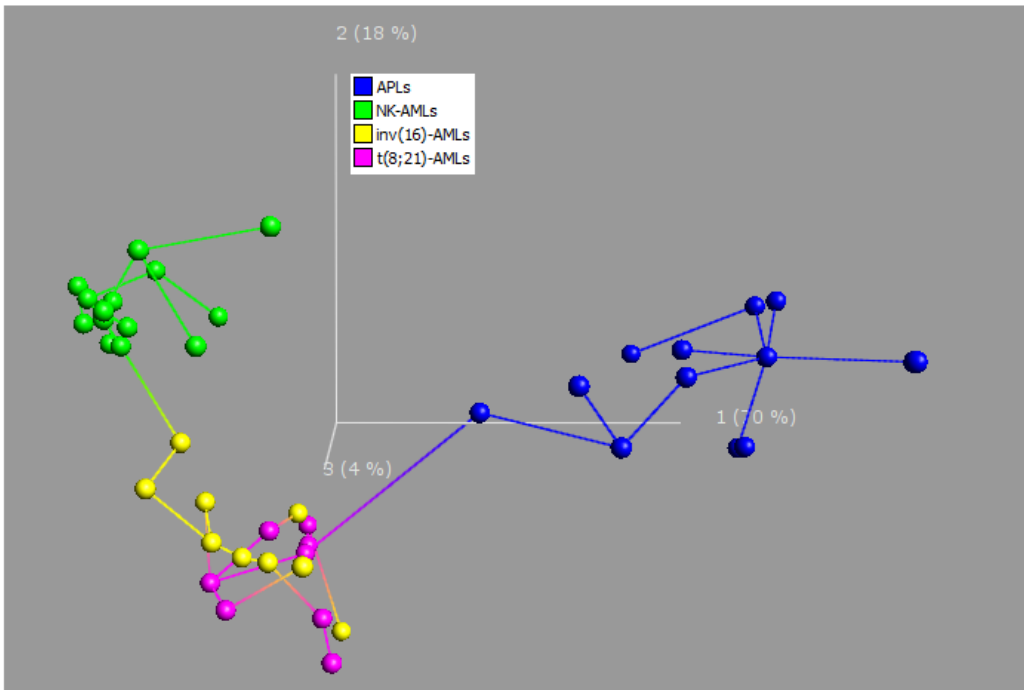
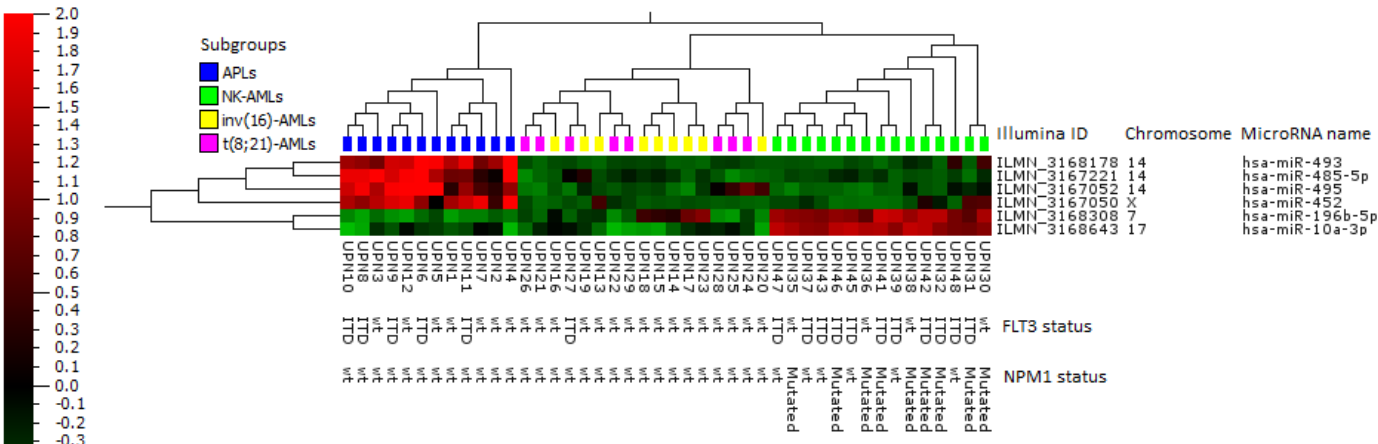


Figure 3.

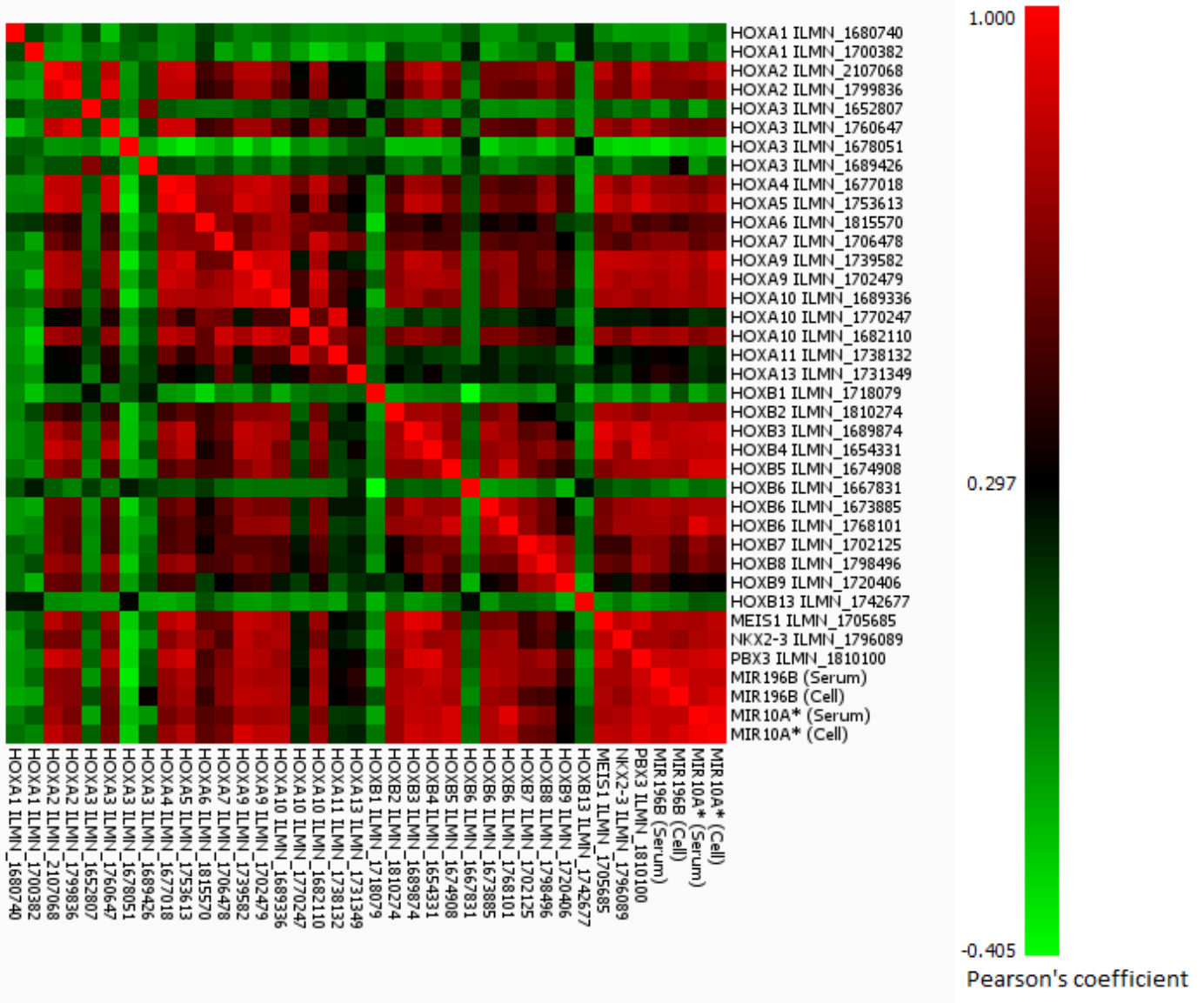
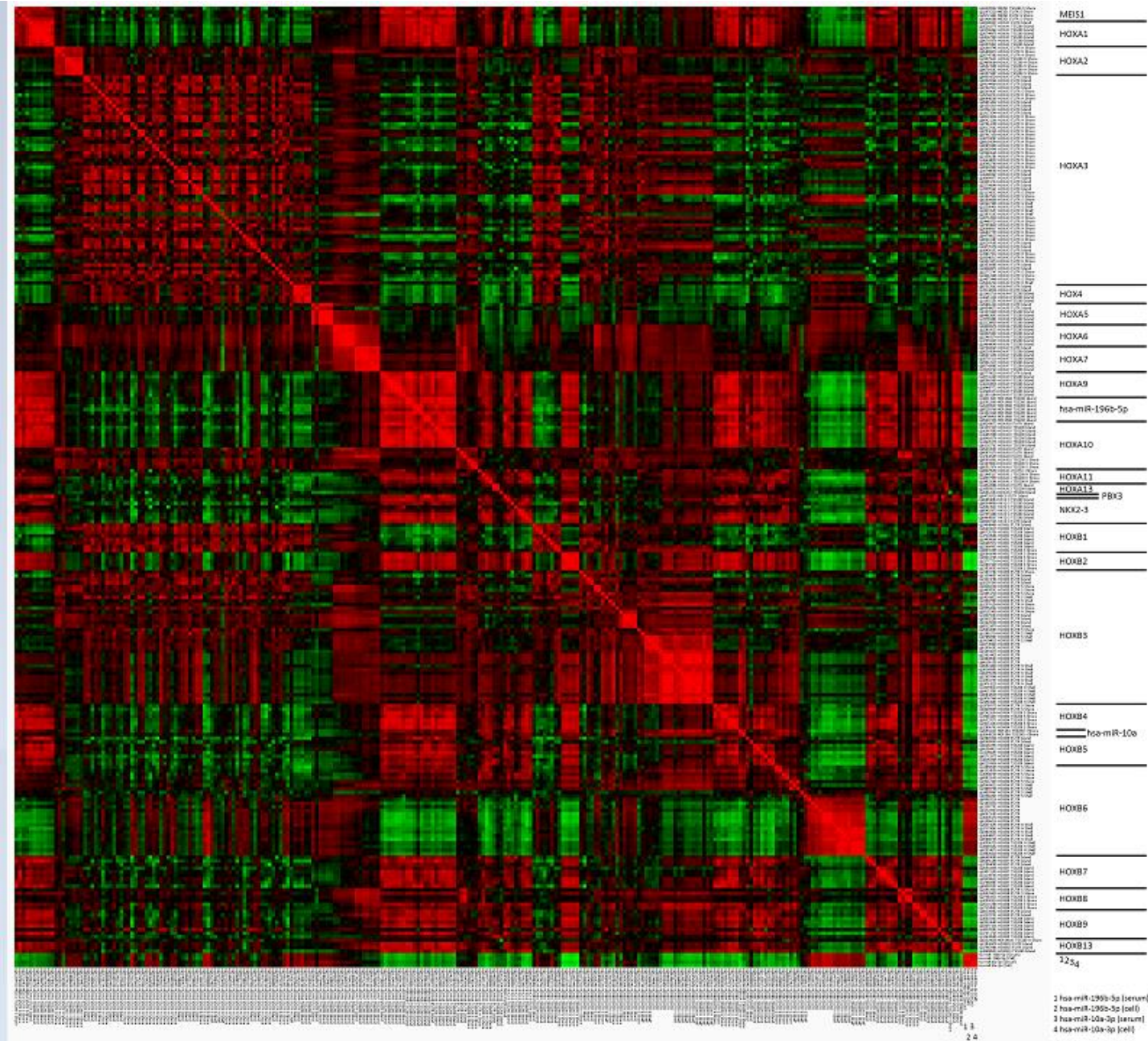


Figure 4.



SUPPLEMENTARY FILE

METHODS

Characteristics of the patients

Conventional cytogenetic banding, fluorescence *in situ* hybridization or RT-PCR analysis of fusion gene transcripts were used to identify patients with APL, t(8;21)-AML or inv(16)-AML, as previously reported¹. Detection of *FLT3* internal tandem duplication (ITD), *NPM1* and *CEBPA* mutations were performed for all AML patients, as described elsewhere²⁻⁴. No patients with *CEBPA* mutations were considered in this study. Additional information about AML patients are summarized in Table Suppl1 below. APL patients were considered to be CD34-positive when at least 50 percent of the leukemic cells were stained by a PE mouse anti-CD34 monoclonal antibody (581) (BD Pharmingen™ – BD Biosciences, San Jose, USA) by flow cytometry on 50,000 analyzed events.

Isolation of serum microRNAs

After collection of the whole blood, the sera were prepared by leaving the blood undisturbed at room temperature for at least 30 minutes, allowing it to clot. After centrifugation at 2200g for 10 minutes at 20°C, sera were collected, frozen at -80°C overnight, and stored in liquid nitrogen. Regarding serum microRNA isolation, for all samples, 150 microliters of serum were used to extract total RNAs with the miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. To monitor RNA recovery and reverse transcription efficiency, 3.5 microliters of synthetic *C. elegans* miRNAs *cel-miR-39* (at 1.6×10^8 copies/microliters, synthetic RNA oligonucleotide from Qiagen) were added to each serum sample before the chloroform step. For all samples, total RNAs were eluted in 14 microliters of RNase-free water.

Isolation of cellular microRNAs

Blasts were purified by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation from bone marrow samples obtained at diagnosis (Nygaard, Oslo, Norway), then immediately cryopreserved at -80°C. Each cell sample was lysed with 1 milliliter of TRI Reagent® (Thermo Fisher Scientific Incorporation, Waltham, USA). MicroRNAs were extracted using the *mirVana* RNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific Incorporation, Waltham, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNAs were eluted in 100 microliters of RNase-free water.

Microarray-based microRNA profiling

Either five microliters of total RNA extracted from serum samples or 400 nanograms of cellular total RNA were processed according to Illumina's instructions (Illumina Incorporation, San Diego, USA). The Human v2 miRNA Beadchip with UDG kit (Illumina Incorporation, San Diego, USA), which assessed the expression level of 1145 microRNAs were used according to the manufacturer's instructions. MicroRNAs were detected and quantitated on the Illumina Universal BeadChips 1536 BeadType using an I-Scan system (Illumina Incorporation, San Diego, USA) according to the manufacturer's instructions.

Quantitation of microRNAs by reverse-transcription and real-time quantitative polymerase reaction assay (RQ-PCR)

The expression levels of the following human microRNAs were validated by RQ-PCR assays using the Qiagen miRNA assays (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions: hsa-mir-10a-3p (CAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA), hsa-mir-196b-5p (UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG), hsa-miR-299-5p (UGGUUUACCGUCCCACAUACA), hsa-miR-323-3p (CACAUUACACGGUCGACCUCU), hsa-miR-410-3p (AAUAUAACACAGAUGGCCUGU), and hsa-miR-495-3p (AAACAAACAUGGUGCACUUCUU). Briefly, for all samples, 1.5 microliter of serum was used for reverse-transcription reactions (37°C for 60 minutes, 95°C for 5 minutes followed by

4°C). RQ-PCR assays were performed on an ABI PRISM 7500 Applied device (Thermo Fisher Scientific Incorporation, Waltham, USA). Polymerase chain reaction cycling conditions included an initial step at 95°C for 15 minutes, followed by 40 cycles of 94°C for 15 seconds, then 55°C for 30 seconds and 70°C for 34 seconds. Fluorescence was measured at the last step of each cycle. Melting curves were obtained after each PCR run and showed single PCR products. Expression levels were quantified with the Applied 7500 software (version 2.0.3 - Thermo Fisher Scientific Incorporation, Waltham, USA). All complementary DNA (cDNA) samples, non-RT (without reverse transcriptase) and no-template controls, were studied in triplicates. A Ct value deviation below 0.5 between triplicates was tolerated. Mean cycle threshold (Ct) values and deviations between the triplicates were calculated for all samples.

Sample preparation for gene expression profiling

Blasts and mononuclear cells were purified by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation from bone marrow or peripheral blood samples (Nygaard, Oslo, Norway). Isolated cell samples were then immediately cryopreserved. Total RNAs were extracted from 10^7 thawed cells using RNEasy[®] Mini Kits (Qiagen Incorporation, Valencia, USA). Total RNA quantification was performed using the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Incorporation, Waltham, USA) according to manufacturer's recommendations. The integrity of the extracted RNAs was assessed with the Bioanalyzer 2100 and the RNA6000 Nano kit (Agilent Technologies Incorporation, Santa Clara, USA). A RNA integrity number greater or equal to 7.00 was achieved for all samples. No sign of DNA contamination was detected in any of the samples.

Generation of biotinylated, amplified cRNA

The Illumina Total Prep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems / Ambion, Austin, USA) was used to generate biotinylated, amplified complementary RNA (cRNA) according to the

manufacturer's recommendations. The starting amount of total RNA used for the reactions was 200 nanograms per sample. Briefly, total RNAs were reverse transcribed into cDNA in a reaction volume of 20 microliters comprising 1xFirst Strand Buffer, T7-Oligo(dT) primers, dNTP mix, RNase inhibitor, and ArrayScript enzyme. After a 2-hour incubation at 42°C, 80 microliters of Second Strand Master Mix, including 1x Second Strand Buffer, dNTP mix, DNA polymerase and RNase H, were added to each sample and incubated at 16°C for an additional 2 hours. The resulting cDNAs were then purified by adding 250 microliters of cDNA Binding Buffer to each sample, and passing the mixture through a cDNA Filter Cartridge by centrifugation at 10,000g for one minute. Filters were then washed with Wash Buffer (500 microliters), and dried by centrifugation for an additional minute. cDNAs were eluted with a total of 19 microliters of Nuclease-free Water at 55°C. In Vitro Transcription Master Mix (7,5 microliters), comprising 1x T7 Reaction Buffer, T7 enzyme mix and Biotin-NTP mix, was added to each cDNA sample and incubated at 37°C for 14 hours. The reaction was stopped by adding 75 microliters of Nuclease-free Water. The resulting biotin-labeled cRNAs were then purified by adding 350 microliters of cRNA Binding Buffer and 250 microliters of 100% ethanol to each sample before passing through a cRNA filter cartridge under centrifugation at 10,000xg for one minute. Filters were then washed with 650 microliters of Wash Buffer, and dried by centrifugation for an additional minute. cRNAs were then eluted with 100 microliters of Nuclease-free water preheated to 55°C, and quantified using the Nanodrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, USA).

Hybridization, staining and detection of cRNAs on microarrays

Briefly, 750 nanograms of each cRNA adjusted to a volume of 5 microliters were mixed to 10 microliters of HYB mix pre-warmed in a 58°C oven for 10 minutes. After 5 minutes incubation at 65°C, 15 microliters of each assay sample were loaded onto the center of each array's inlet port. Slides were then placed in a BeadChip Hyb Chamber and incubated in a 58°C oven for 18 hours with rotation. After hybridization, each BeadChip was submerged in Wash

E1BC solution to remove their cover seal and transferred into the Hybex Waterbath insert containing Hight-Temp Wash buffer to be incubated 10 minutes at 55°C. Slides were then washed, successively in Wash E1BC solution for 5 minutes, 100% ethanol for 10 minutes and again in Wash E1BC solution for 2 minutes, on an orbital shaker at 120 rpm. In order to block and detect BeadChips, slides were incubated 10 minutes with Block E1 buffer, followed by 10 minutes incubation with Block E1 buffer containing 1 microgram per milliliter of streptavidin-Cy3 (Amersham, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). These incubations were performed on a rocker platform with rocker shaking at 50 rpm. After a last wash in Wash E1BC for 5 minutes with orbital shake at 120 rpm, slides were dried by centrifugation at 275g for 4 minutes at 25°C. BeadChips were then stored in the dark until they were scanned using the I-Scan reader (Illumina Incorporation, San Diego, USA). The Human HT-12 v3 Expression BeadChip assesses a total of 48,803 marker probes, of which 27,455 are NM coding transcripts; and 7,870 are XM coding transcripts (RefSeq Content, Build 36.2, Release 22). It also contains 12,837 experimentally confirmed mRNA sequences that aligned to EST clusters (UniGene, Build 199).

Isolation and quantitation of cellular DNA

Cellular DNA was extracted from 5 million mononucleated cells using the Mini Kit Qiamp (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Double-stranded DNA (dsDNA) was quantified using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assays Kit (Invitrogen, Oregon, USA) and the NanoDrop ND-3300 spectrofluorometer (Thermo Fisher Scientific Incorporation, Waltham, USA) according with the manufacturer's instructions.

DNA bisulfite conversion

The EZ-96 DNA Methylation Kit (Zymo Research/Proteigene) was used to treat DNA with bisulfite, which converts unmethylated cytosines into uracil, according to the manufacturer's recommendations. Briefly, the starting amount of double strand DNA was 500 nanograms

per sample. DNA samples were prepared in a reaction volume of 50 microliters with the Dilution Buffer. After an incubation at 37°C during 15 minutes, 100 microliters of the CT Conversion Reagent including bisulfite were added to each sample and incubated in a thermocycler at 95°C during 30 seconds then at 50°C during 60 minutes for 16 cycles, then followed by 10 minutes at 4°C. Treated DNA samples were purified by adding 400 microliters of MBinding Buffer to each sample, and passing the mixture through a Zymo-Spin filter column for a 5-minutes centrifugation at 3000g. This step was performed twice. Then, 200 milliliters of MDesulphonation Buffer were added to each sample on the filters, and held at room temperature for 15 minutes. The samples were subsequently washed with 500 microliters of Wash Buffer and centrifuged at 3000g for 10 minutes. DNA samples were then eluted with 12 microliters of MEluation Buffer.

Microarray-based DNA methylation profiling

Amplification, hybridization, staining and detection of DNA on Illumina Infinium Methylation HM-450 BeadChips were performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, 4 microliters (representing 200 nanograms of double strand DNA) of each bisulfite-converted DNA sample were mixed to 20 microliters of MA1 in a microplate. Four microliters of NaOH 0,1M were then added in each well and vortexed at 1600 rpm for 1 minute, then centrifuged at 280g for one minute, and incubated for 10 minutes at room temperature. Subsequently, 68 microliters of RPM and 75 microliters of MSM were dispensed into each well containing the samples, and mixed by inversion. After a centrifugation at 280g during 1 minute, the plate was incubated for 21 hours at 37°C in an hybridization oven. The day after, 50 microliters of FMS were added to each well containing amplified DNA. The plate was then sealed and vortexed at 1600 rpm during 1 minute and centrifuged at 50g during 1 minute. The plate was subsequently placed on a 37°C heat block for 1 hour for DNA fragmentation. After this incubation, each DNA sample was precipitated by adding 100 microliters of PM1 and 300 microliters of 100% 2-propanol, mixed by inversion of the plate at least 10 times and incubated at 4°C during 30 minutes, centrifuged at 4°C during 20

minutes, and decanted by a quick inversion of the plate. The plate was then left inverted on a tube rack for 1 hour at room temperature to air dry the pellet. After drying, 46 microliters of RA1 were added to each well of the plate containing a DNA pellet, and the plate was placed in the hybridization oven for 1 hour at 48°C. DNA was then mixed by vortexing at 1800 rpm during 1 minute, centrifuged, placed on a heat block to denature the samples at 95°C during 20 minutes, and cooled at room temperature for 30 minutes. At this time, 15 microliters of each sample was dispensed onto the appropriate BeadChip section, slides were placed in a BeadChip chamber and incubated in the oven at 48°C for 18 hours with rotation. The following day, the coverseal of each BeadChip was removed and each slide submerged in PB1 during 1 minute and in a new PB1 during an additional minute. Then, each BeadChip was assembled with a flow-through chamber for staining. Each flow-through chamber was put in a chamber rack adapted with a water circulator at 44°C. The single-base extension was realized by adding successively 150 microliters of RA1 five times, 450 microliters of XC1 for 10 minutes, 450 microliters of XC2 for 10 minutes, 200 microliters of TEM for 15 minutes, 450 microliters of 95% formamide 1mM EDTA for 1 minute twice and 450 microliters of XC3 for 1 minute twice. Then, the staining was performed at 32°C by adding 250 microliters of STM for 10 minutes, 450 microliters of XC3 twice, 250 microliters of ATM for 10 minutes, 450 microliters of XC3 twice, repeated once and by finally adding 250 microliters of STM for 10 minutes. Slides were then disassembled and submerged in PB1 wash during 5 minutes, followed by a 5-minute incubation with XC4 for coating. BeadChips were then dried in a vacuum desiccator during 50 minutes. Beadchips were then stored in the dark until they were scanned using the I-Scan Reader (Illumina Incorporation, San Diego, USA).

Data analyses

GenomeStudio 2011.1 software and its Gene Expression Analysis Module (version 1.9.0) (Illumina Incorporation, San Diego, USA) was used for signal extraction and quantile normalization of mRNA and microRNA microarray-derived data. GenomeStudio's Methylation module (version 1.9.0) was used for signal extraction and signal-based

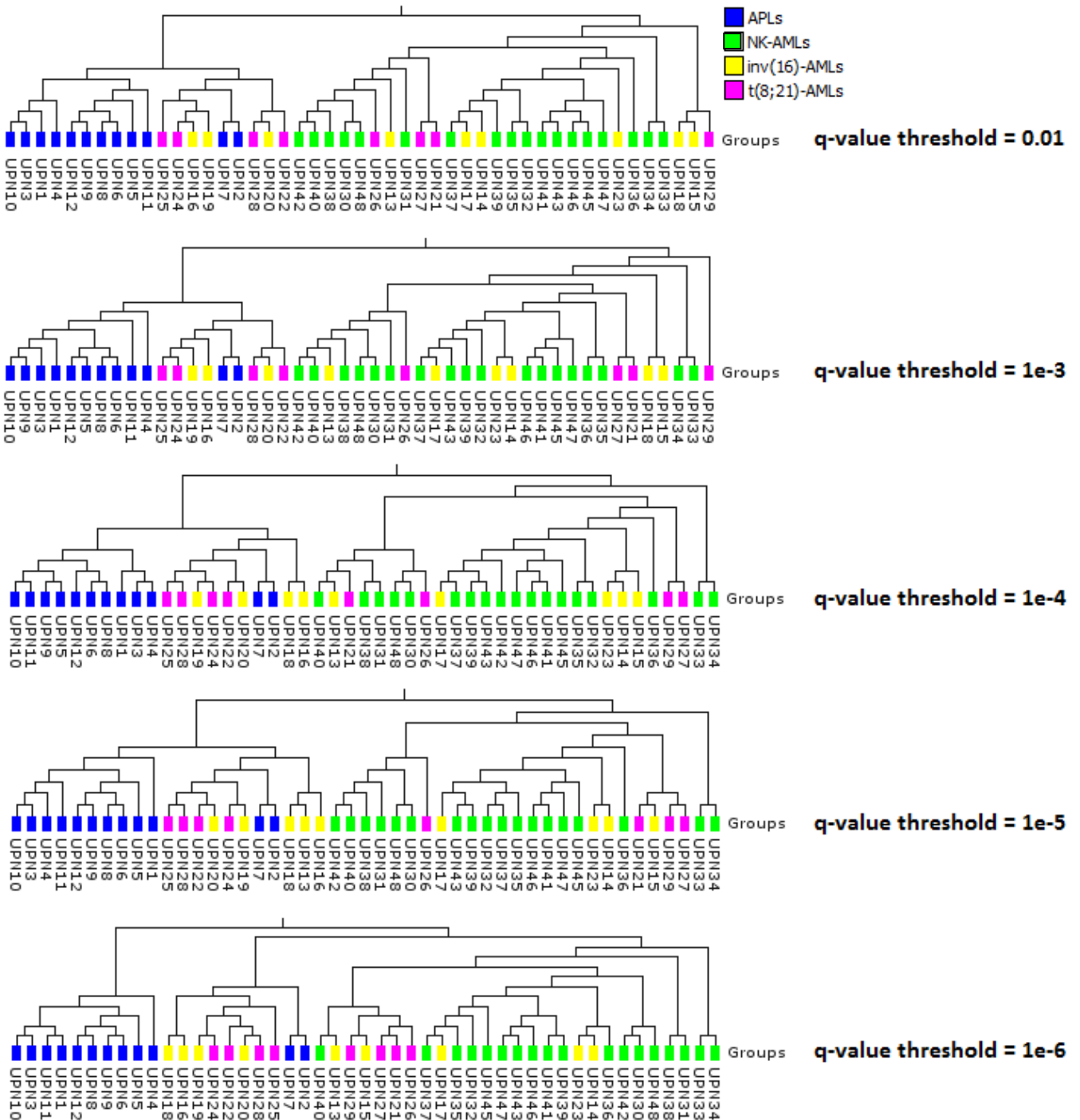
normalization of CpG methylation microarray-derived data. Omics Explorer 3.0.35 software (Qlucore AB, Lund, Sweden) was used on log-transformed data for 3D-principal component analyses, hierarchical clustering analyses, linear regression analyses, as well as for multigroup (one-way analysis of variance) or two-group comparisons (t-tests). The microarray dataset discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and is accessible through GEO Series accession number **X** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=X>).

REFERENCES

1. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ: Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003,17:2318-57.
2. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, Terre C, Tigaud I, Castaigne S, Raffoux E, De Botton S, Fenaux P, Dombret H, Preudhomme C: Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*. 2005,106:3618-20.
3. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S: Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996,10:1911-8.
4. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG: Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2001,27:263-70.

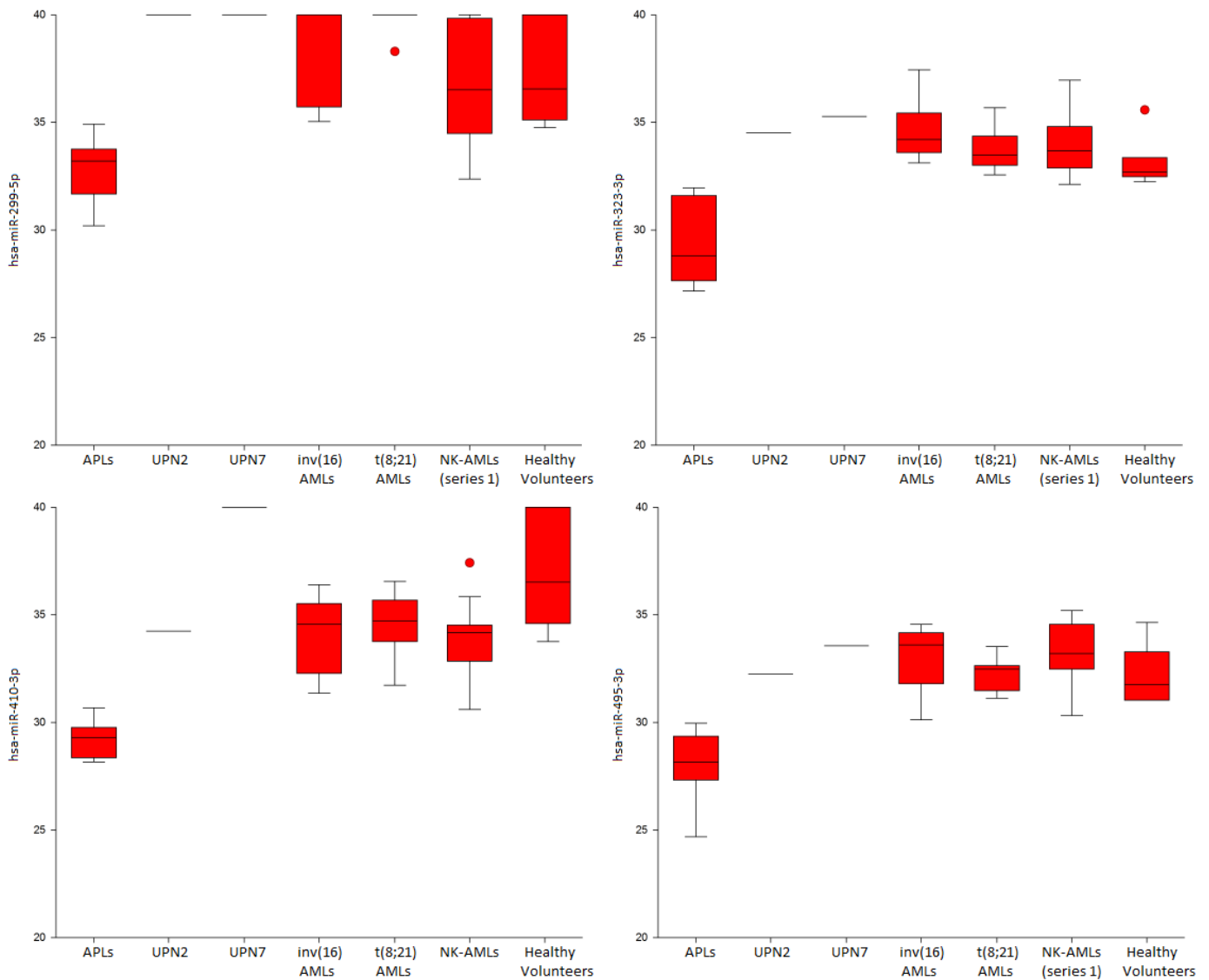
SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure Suppl1.



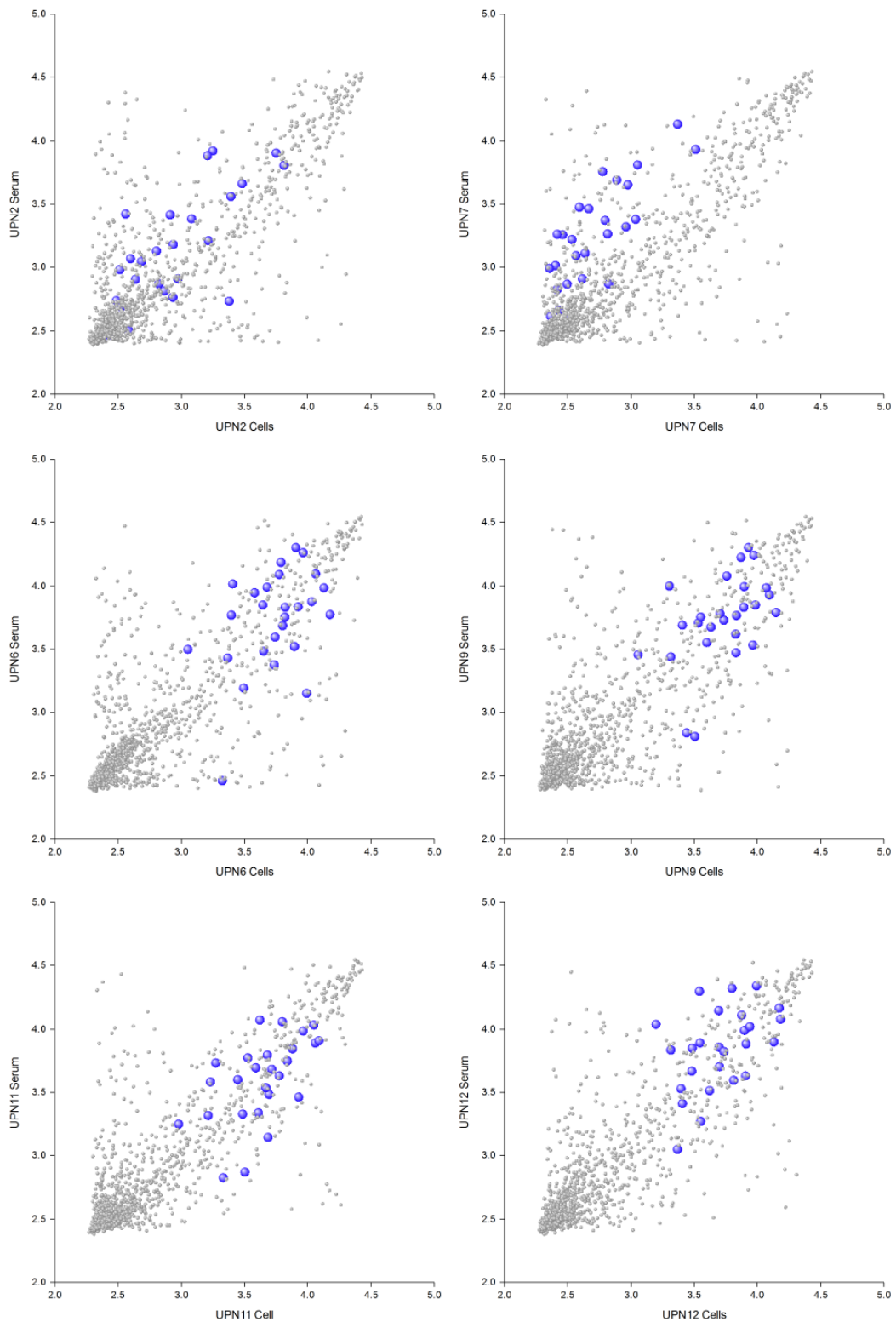
One-dimension hierarchical clustering analysis of the 47 AML samples (APLs, n=12, inv(16)-AMLs, n=9; t(8;21)-AMLs, n=8; NK-AMLs, n=18) according to the expression levels of the 192, 104, 61, 33 and 15 serum microRNAs identified through a multigroup comparison based on a one-way analysis of variance with successive q-value thresholds ranging from 10^{-2} to 10^{-6} , respectively. Each column represents a sample.

Figure Suppl2.



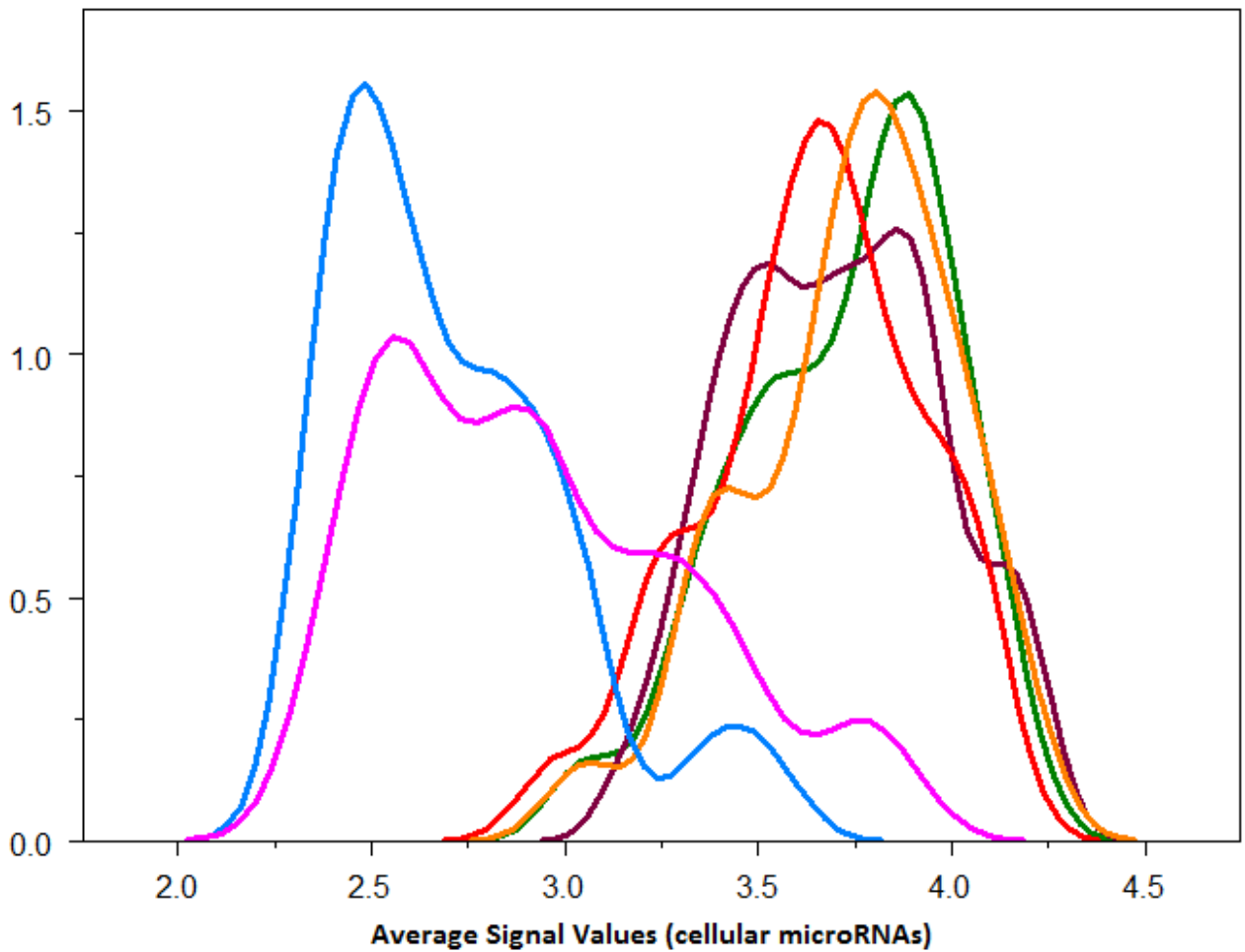
Quantitation of hsa-miR-299-5p (top left), hsa-miR-323-3p (top right), hsa-miR-410-3p (bottom left) and hsa-miR-495-3p (bottom right) serum expression levels in 47 AML patients at diagnosis (APLs, n=12; inv(16)-AMLs, n=9; t(8;21)-AMLs, n=8; NK-AMLs, n=18) as well as in seven healthy volunteers by RQ-PCR assays (y-axis, Ct values). The black horizontal line in the interior of the box is located at the median of the data. The height of the box is equal to the interquartile distance, which is the difference between the third and first quartiles of the data. The interquartile distance indicates the spread of the distribution for the data. The whiskers (the lines extending from the bottom and the top parts of the box) go to the nearest value not beyond the span from the quartiles, i.e., 1.5 time the interquartile distance from the center of the data. Points above or below the whiskers are considered outliers and are drawn individually, indicated as red dots). Regarding hsa-miR-299-5p, hsa-miR-323-3p and hsa-miR-410-3p, when no signal was obtained, the Ct value was arbitrarily set to 40.

Figure Suppl3.



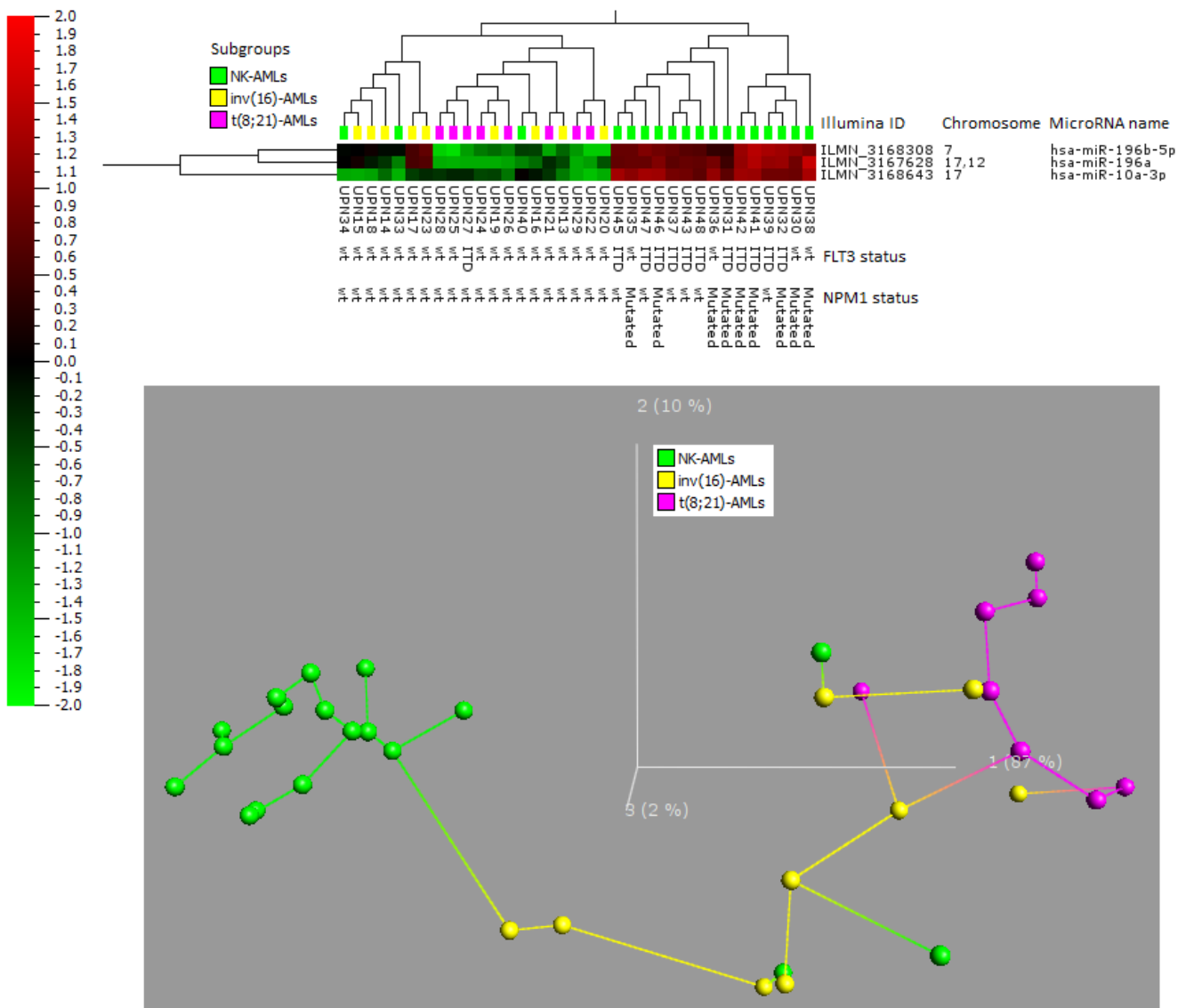
Scatter plots representing the log-transformed expression levels of the 26 APL-specific 14q32miRs (blue dots) and of the other microRNAs (gray dots) assessed by microarrays on simultaneously collected serum and marrow diagnostic samples from six APL patients (x axis, average signals of the 1145 microRNAs assessed on the cellular sample; y axis, average signals of the 1145 microRNAs assessed on the corresponding serum sample).

Figure Suppl4.



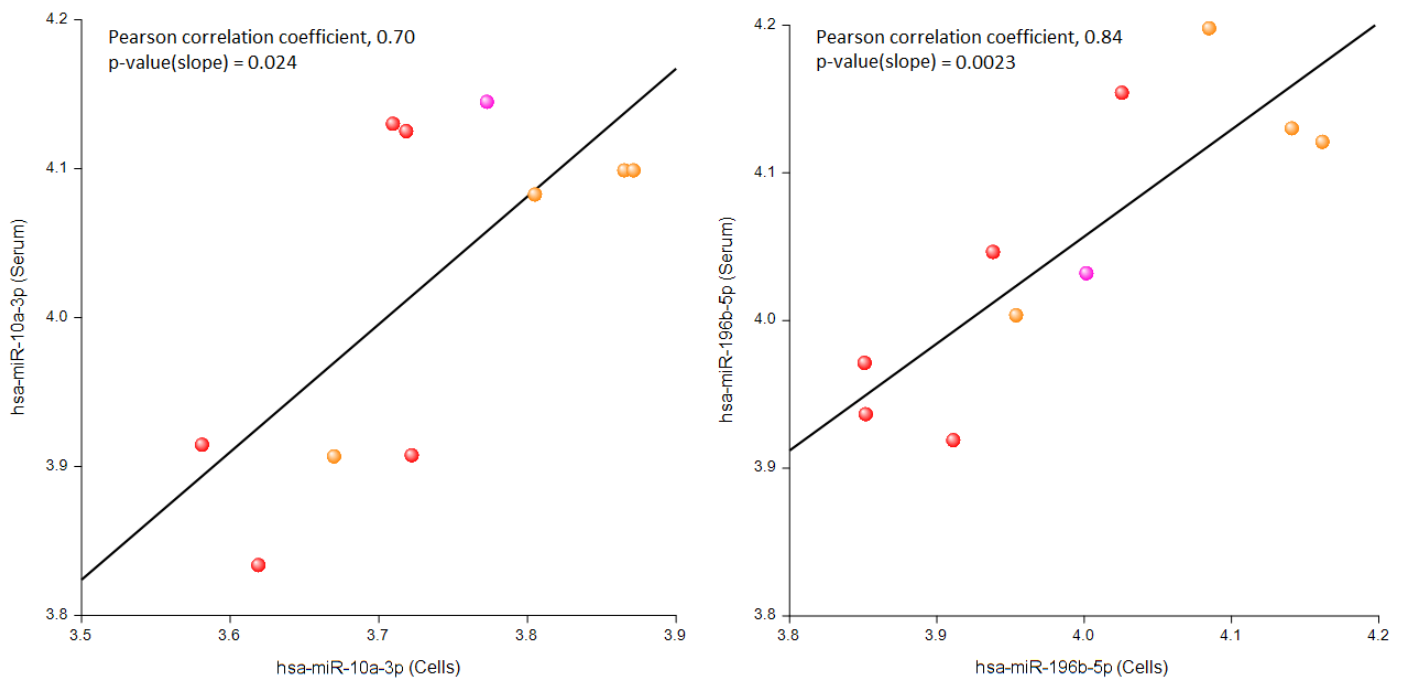
Density plot summarizing the distribution of the cellular expression levels of the 26 APL-specific 14q32miRs in four “classic” APL patients (blue, orange, green, brown lines) as well as in the two “atypical” APL patients, UPN2 (blue line) and UPN7 (pink line) as assessed by the microarray-derived average signals of those 26 microRNAs (log-transformed data).

Figure Suppl5.



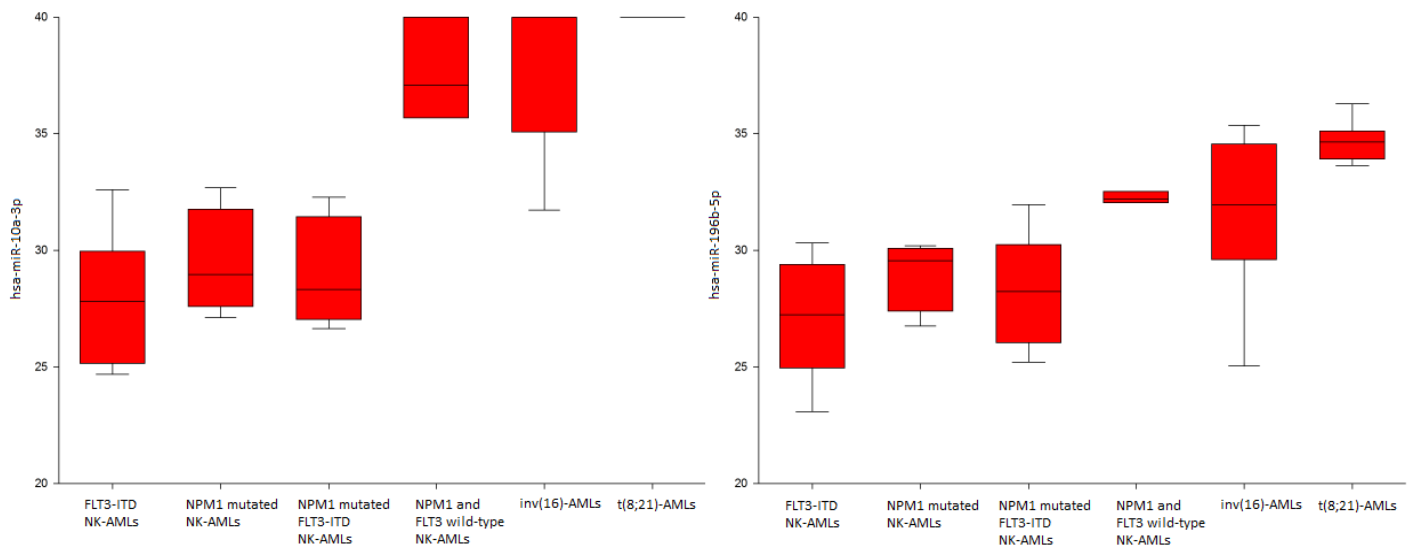
Top. Heatmap and 2-dimension hierarchical clustering analysis based on the serum microarray-derived expression levels of the three microRNAs differentially expressed between patients with NK-AML (n=18), inv(16)-AML (n=9) and t(8;21)-AMLs (n=8). A one-way analysis of variance approach and a threshold q-value of 10^{-3} were considered for this analysis. Columns represent samples; rows represent microRNA. The log₂ relative expression scale is depicted on the left. **Bottom.** Principal component analysis based on the serum expression levels of the three microRNAs identified above as being differential expressed between patients with NK-AML (n=18), inv(16)-AML (n=9) and t(8;21)-AMLs (n=8). The cumulative percentage of explained variance with the first axis of this principal component analysis was 87 percent.

Figure Suppl6.



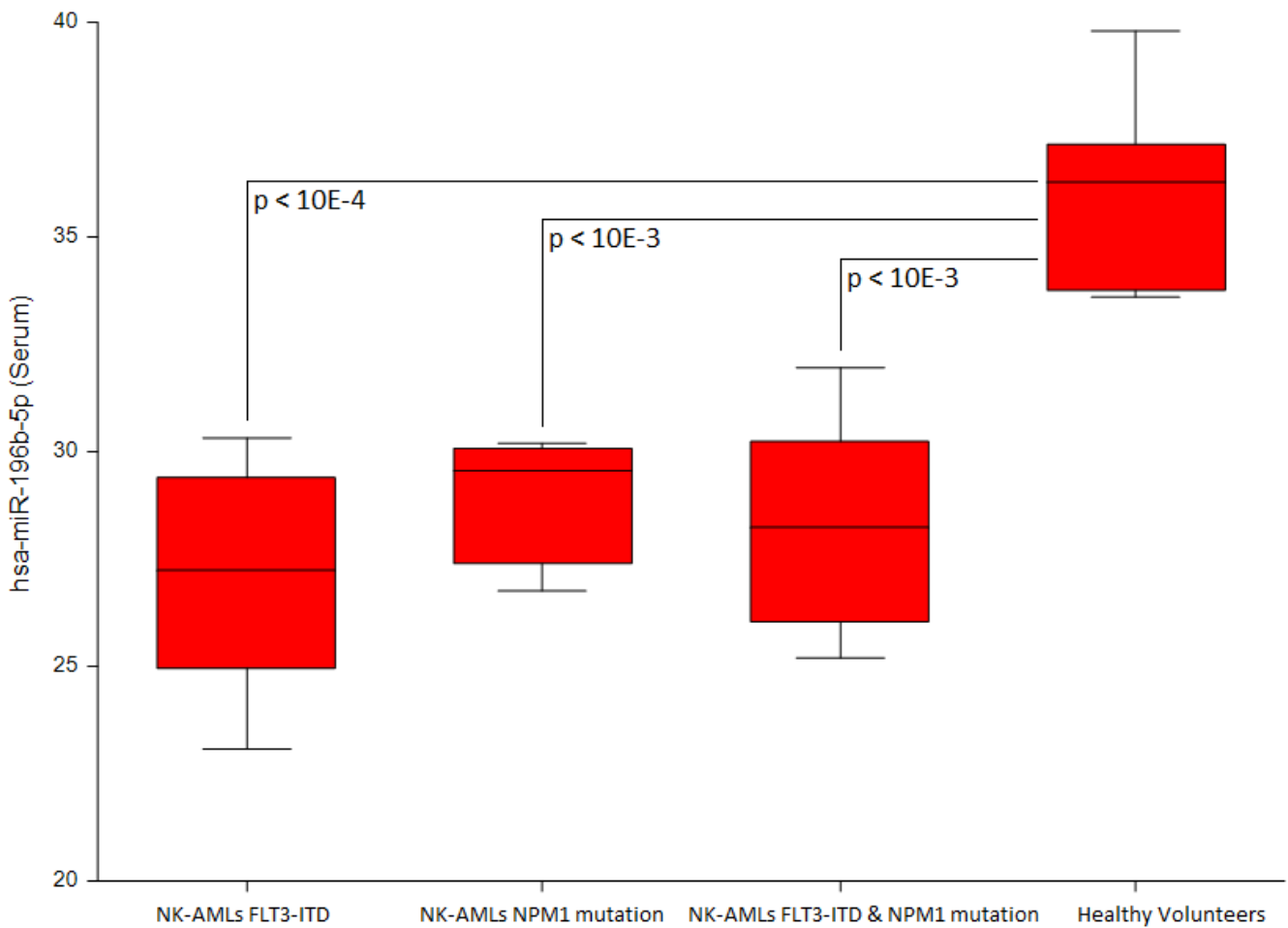
Linear relationship between cellular (x-axis) and serum (y-axis) expression levels for both hsa-miR-10a-3p (left) and hsa-miR-196b-5p (right) as assessed by microarrays in 10 NK-AML patients (log-transformed data). The black line represents the linear regression line based on these data for the overall group of patients. Red, pink and orange dots represent NK-AML patients with *FLT3*-ITD alone, *NPM1* mutation alone or with both mutations, respectively.

Figure Suppl7.



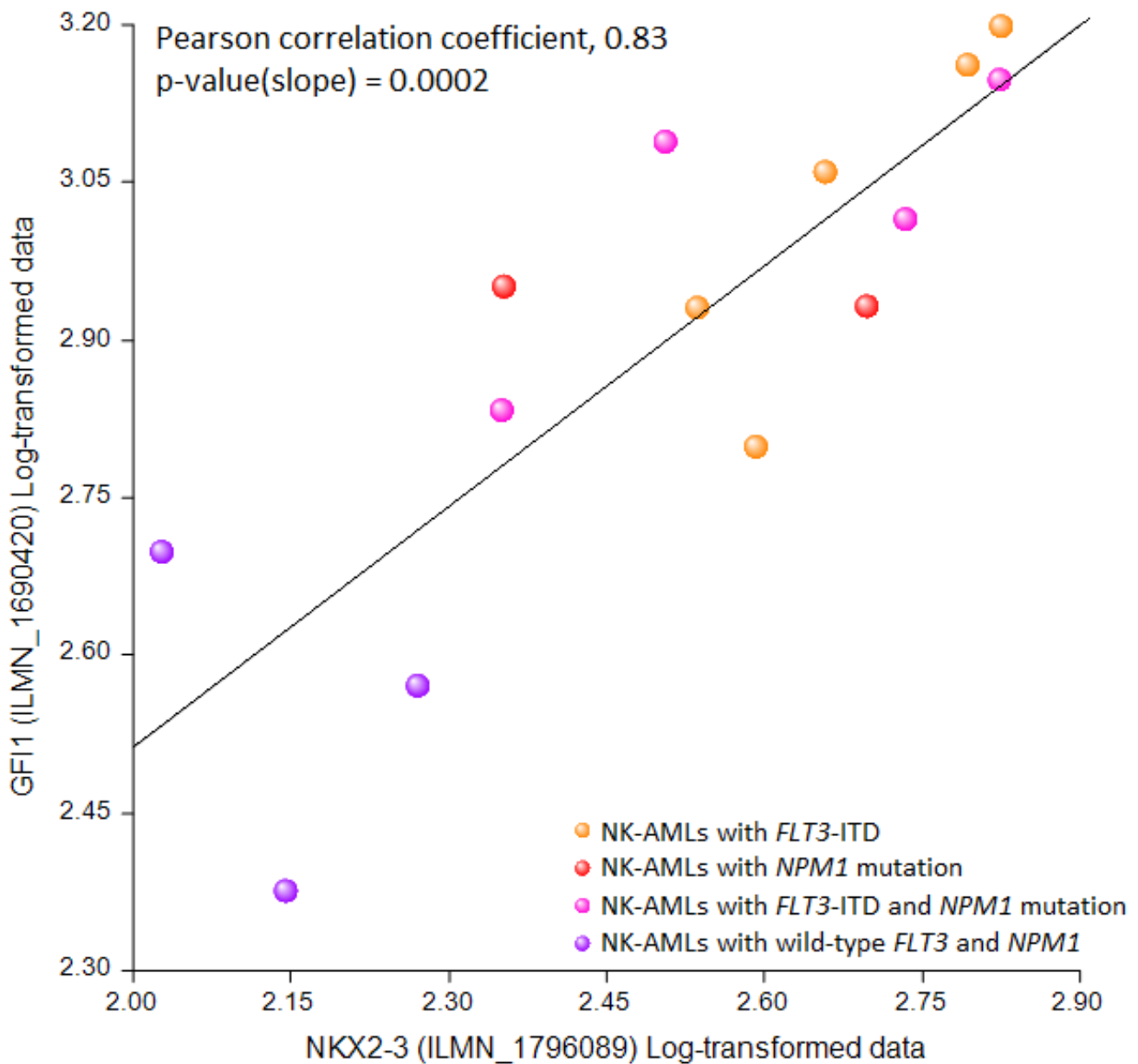
Serum expression levels of hsa-miR-10a-3p (left) and hsa-miR-196b-5p (left) in patients diagnosed with either NK-AML (n=18), inv(16)-AML (n=9) or t(8;21)-AML (n=8). NK-AML patients were separated according to the presence or not of a *NPM1* mutation and/or a *FLT3*-ITD. Y axis represents Ct values. Regarding hsa-miR-10a-3p, no signal was obtained for 15 patients with either inv(16)-AML (n=6), t(8;21)-AML (n=8) or NK-AML with wild-type *NPM1* and *FLT3* (n=1). In those cases, the Ct value was arbitrarily set to 40.

Figure Suppl8.



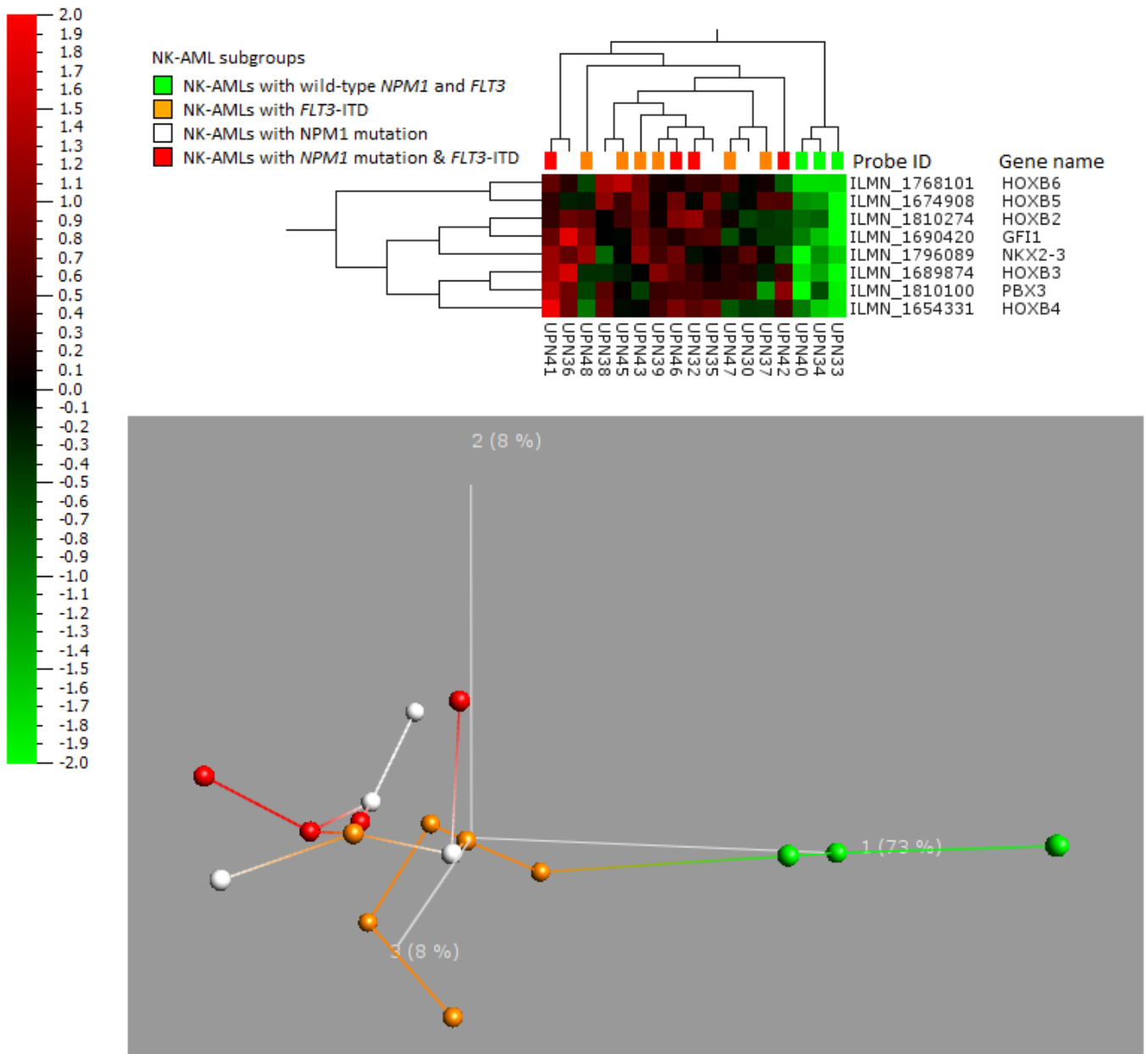
Serum expression levels of hsa-miR-196b-5p in seven healthy volunteers and 15 NK-AML patients with *NPM1* mutation alone (n=4), *FLT3*-ITD alone (n=5) or with both mutations (n=6). The difference between NK-AML patients and the healthy volunteers was highly significant ($p < 10^{-5}$). Y axis represents Ct values.

Figure Suppl9.



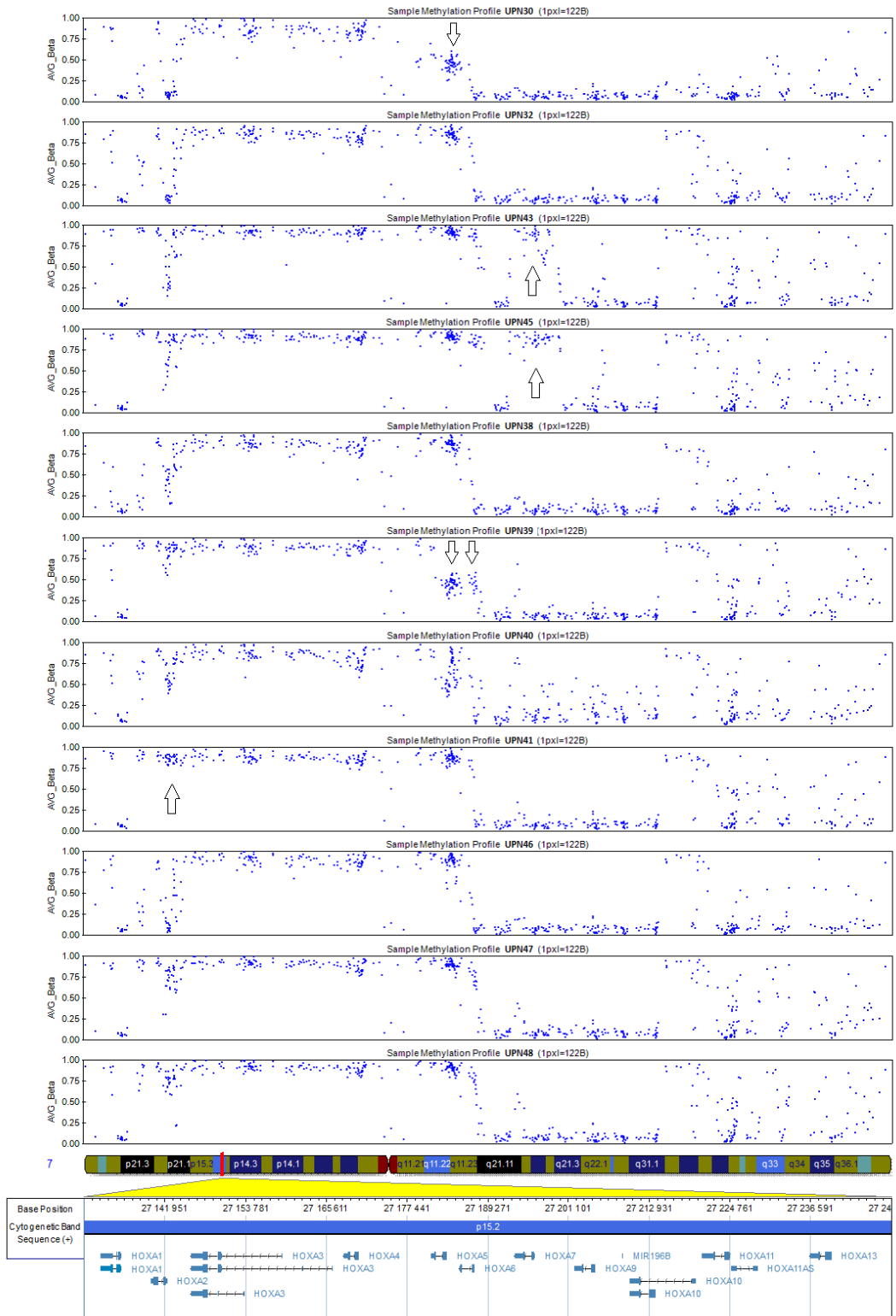
NKX2-3 and *GF11* expression levels as assessed by microarrays in the 14 NK-AML patients with samples containing a least 80 percent blasts. The black line represents the linear regression line based on these data for the overall group of patients. Orange, red, pink and purple dots represent NK-AML patients with *FLT3*-ITD alone, *NPM1* mutation alone, with both mutations or with wild-type *NPM1* and *FLT3*, respectively.

Figure Suppl10.



Top. Heatmap and 2-dimension hierarchical clustering analysis based on the results of a differential expression analysis comparing the NK-AML patients with wild-type *FLT3* and *NPM1* to the NK-AML patients with *NPM1* mutation and/or *FLT3*-ITD. This analysis was restricted to the HOXA and HOXB genes as well as to *GFI1*, *MEIS1*, *NKX2-3* and *PBX3*, and considered a threshold q-value of 10^{-2} . Columns represent samples; rows represent gene transcripts. The log₂ relative expression scale is depicted on the left. **Bottom.** Principal component analysis based on the eight transcripts found differentially expressed above. The cumulative percentage of explained variance with the first three axis of this principal component analysis was 89 percent.

Figure Suppl11.



Methylation level of the CpG sites belonging to the HOXA locus. Each blue dot is a CpG site. Y axis represents the methylation level of the CpG sites according to Illumina average Beta-value. Hypomethylated and hypermethylated CpG sites have average Beta-values close to 0 and to 1, respectively. Arrows show CpG sites' regions varying between NK-AML patients.

SUPPLEMENTARY TABLES

Table Suppl1. Characteristics of the 47 AML patients involved in the study.

Covariates	N=	APLs 12	inv(16)-AMLs 9	t(8;21)-AMLs 8	NK-AMLs 18
Gender					
Females		7	2	6	12
Males		5	7	2	6
Age at diagnosis (years)					
Median		32	32	38	55
Range		18-78	21-61	31-76	25-78
Leukocytosis at diagnosis (G/L)					
Median		2.5	34.0	12.2	79.7
Range		0.5-32.0	2.0-288.0	2.5-139.0	1.3-172.0
Additional cytogenetic abnormalities					
<i>FLT3</i> -ITD		4	3	5	0
<i>NPM1</i> mutation		5	0	1	11
<i>CEBPA</i> mutation		0	0	0	9
		0	0	0	0
Wild-type <i>FLT3</i> and <i>NPM1</i>		-	-	-	3
<i>FLT3</i> -ITD and wild-type <i>NPM1</i>		-	-	-	6
<i>NPM1</i> mutated and no <i>FLT3</i> -ITD		-	-	-	4
<i>FLT3</i> -ITD and mutated <i>NPM1</i>		-	-	-	5

Table Suppl2. Results of the analyses linking, in APL patients, the serum expression levels of the APL-specific 14q32miRs - as assessed by microarrays - to leukocytosis, prothrombin time (linear regression); and to *FLT3*-ITD and CD34 positivity of the blasts (t-test).

PROBE_ID	ILMN_GENE	WBC at diagnosis (G/L)		Prothrombin time		<i>FLT3</i> -ITD or CD34 positivity p-values
		p-values	Pearson Correlation coefficient	p-values	Pearson Correlation coefficient	
ILMN_3168025	hsa-miR-134	NS	--	0.0012	-0.82	NS
ILMN_3167624	hsa-miR-136	0.046	0.58	NS	--	NS
ILMN_3168667	hsa-miR-136*	0.0043	0.76	NS	--	0.00066
ILMN_3167522	hsa-miR-154	0.02	0.66	0.02	-0.67	0.0052
ILMN_3167913	hsa-miR-299-5p	0.0034	0.77	NS	--	0.0024
ILMN_3167956	hsa-miR-323-3p	0.0007	0.84	0.026	-0.64	0.00088
ILMN_3167458	hsa-miR-369-3p	0.022	0.65	NS	--	0.019
ILMN_3166941	hsa-miR-376c	NS	--	0.006	-0.74	NS
ILMN_3168481	hsa-miR-377	NS	--	NS	--	NS
ILMN_3167443	hsa-miR-379	NS	--	NS	--	NS
ILMN_3168477	hsa-miR-381	NS	--	0.0004	-0.85	NS
ILMN_3167239	hsa-miR-382	0.01	0.71	0.042	-0.59	0.022
ILMN_3167969	hsa-miR-409-3p	NS	--	NS	--	NS
ILMN_3167244	hsa-miR-410	NS	--	0.0019	-0.8	NS
ILMN_3167818	hsa-miR-432	NS	--	0.047	-0.58	NS
ILMN_3167973	hsa-miR-433	0.039	0.60	0.016	-0.67	NS
ILMN_3167221	hsa-miR-485-5p	NS	--	0.0042	-0.76	NS
ILMN_3166948	hsa-miR-487a	NS	--	NS	--	NS
ILMN_3167805	hsa-miR-487b	0.011	0.70	NS	--	0.035
ILMN_3168178	hsa-miR-493	NS	--	NS	--	NS
ILMN_3167972	hsa-miR-493*	0.011	0.70	0.045	-0.59	NS
ILMN_3168446	hsa-miR-494	NS	--	NS	--	NS
ILMN_3167052	hsa-miR-495	0.0055	0.74	0.029	-0.63	0.028
ILMN_3168289	hsa-miR-625	NS	--	NS	--	NS
ILMN_3168801	hsa-miR-654-3p	NS	--	NS	--	0.051
ILMN_3168127	hsa-miR-655	NS	--	NS	--	0.045
ILMN_3168467	hsa-miR-656	0.0044	0.76	NS	--	0.032

Résultats

Table Suppl3. Linear regression analyses assessing the relationship between serum or cellular expression levels of hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10a-3p with the corresponding blasts' expression levels of HOX/TALE genes in patients with APL, inv(16)-AML, t(8;21)-AML or NK-AML.

PROBE_ID	GENE NAME	hsa-miR-196b-5p (serum)		hsa-miR-10a-3p (serum)		hsa-miR-196b-5p (cell)		hsa-miR-10a-3p (cell)	
		q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic
ILMN_1700382	HOXA1, transcript variant 1	1.00	-0.002	0.93	0.053	1.00	-0.005	0.93	-0.058
ILMN_1680740	HOXA1, transcript variant 2	0.79	-0.113	0.97	-0.021	0.72	-0.187	0.88	-0.091
ILMN_1799836	HOXA2	0.0013	0.648	0.013	0.599	0.018	0.615	0.0013	0.726
ILMN_2107068	HOXA2	0.0036	0.613	0.0039	0.643	0.021	0.605	0.00065	0.746
ILMN_1652807	HOXA3, transcript variant 1	0.88	-0.073	0.53	-0.245	0.94	0.053	0.87	0.096
ILMN_1760647	HOXA3, transcript variant 2	4.64E-05	0.733	0.0011	0.676	0.0023	0.706	8.05E-05	0.791
ILMN_1678051	HOXA3, transcript variant 3	0.17	-0.377	0.49	-0.260	0.53	-0.275	0.54	-0.262
ILMN_1689426	HOXA3, transcript variant 3	0.80	0.112	0.76	-0.141	0.38	0.345	0.90	0.078
ILMN_1677018	HOXA4	6.23E-05	0.725	0.0096	0.612	0.0029	0.696	0.00012	0.782
ILMN_1753613	HOXA5	6.25E-08	0.826	0.0026	0.655	4.44E-06	0.848	4.84E-08	0.882
ILMN_1815570	HOXA6	0.00031	0.688	0.0023	0.659	0.012	0.638	0.00024	0.767
ILMN_1706478	HOXA7	0.00037	0.682	0.028	0.558	0.0067	0.665	0.0053	0.681
ILMN_1702479	HOXA9	4.29E-07	0.802	0.00023	0.714	0.00012	0.782	8.37E-08	0.876
ILMN_1739582	HOXA9	5.52E-12	0.907	0.00012	0.729	1.30E-08	0.907	7.63E-13	0.948
ILMN_1682110	HOXA10, transcript variant 1	1.32E-05	0.755	0.0032	0.649	0.00054	0.751	2.41E-06	0.841
ILMN_1689336	HOXA10, transcript variant 1	4.84E-11	0.892	0.00012	0.727	6.98E-07	0.869	1.63E-10	0.921
ILMN_1770247	HOXA10, transcript variant 2	0.45	0.253	0.55	0.233	0.59	0.246	0.50	0.276
ILMN_1738132	HOXA11	0.35	0.293	0.73	0.156	0.64	0.226	0.66	0.207
ILMN_1731349	HOXA13	0.32	0.306	0.61	0.206	0.47	0.304	0.57	0.246
ILMN_1718079	HOXB1	0.64	-0.177	0.58	-0.221	0.96	-0.036	0.92	-0.068
ILMN_1810274	HOXB2	7.18E-09	0.850	0.0015	0.669	1.56E-07	0.885	0.0002	0.772
ILMN_1689874	HOXB3	8.12E-08	0.822	2.40E-09	0.861	3.32E-05	0.811	7.61E-11	0.926
ILMN_1654331	HOXB4	1.83E-09	0.866	3.48E-07	0.812	5.24E-06	0.844	5.05E-07	0.858
ILMN_1674908	HOXB5	6.25E-08	0.827	5.03E-10	0.880	2.91E-05	0.815	7.78E-15	0.964
ILMN_1667831	HOXB6	0.94	-0.037	1.00	0.002	0.97	-0.029	1.00	0.001
ILMN_1673885	HOXB6, transcript variant 3	6.75E-05	0.723	3.25E-05	0.751	0.0059	0.670	0.00011	0.785
ILMN_1768101	HOXB6	9.20E-07	0.791	5.03E-10	0.877	0.00097	0.737	1.13E-09	0.910
ILMN_1702125	HOXB7	0.00037	0.683	0.00039	0.701	0.032	0.581	0.0015	0.720
ILMN_1798496	HOXB8	0.0036	0.613	0.012	0.604	0.093	0.504	0.016	0.622
ILMN_1720406	HOXB9	0.24	0.341	0.56	0.231	0.50	0.286	0.53	0.267
ILMN_1742677	HOXB13	0.92	-0.054	0.93	0.051	0.99	0.014	0.94	0.055
ILMN_1705685	MEIS1	6.23E-09	0.852	7.50E-05	0.737	1.18E-05	0.831	8.80E-06	0.823
ILMN_1796089	NKX2-3	2.82E-06	0.777	3.48E-07	0.812	0.0013	0.729	7.23E-09	0.897
ILMN_1810100	PBX3	1.19E-08	0.844	0.00061	0.691	4.16E-05	0.807	8.37E-08	0.876

Probe_ID, identification number of the Illumina probe on the HT12 v3 microarray assessing gene transcripts; R-statistic, Pearson's correlation coefficient; q-value, p-value of the test adjusted for multiple testing.

Table Suppl4. Linear regression analyses assessing the relationship between serum or cellular expression levels of hsa-miR-196b-5p and hsa-miR-10a-3p with the CpG site methylation levels of HOX/TALE genes in the leukemic cells of patients with APL, inv(16)-AML, t(8;21)-AML or NK-AML.

Illumina ID	Gene Name	hsa-miR-196b-5p (serum)		hsa-miR-10a-3p (serum)		hsa-miR-196b-5p (cell)		hsa-miR-10a-3p (cell)	
		q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic
cg02209932	MEIS1	7.57E-06	-0.83	0.0093	-0.60	0.00036	-0.77	0.001	-0.71
cg12975220	MEIS1	0.0002	-0.75	0.011	-0.59	0.018	-0.58	0.0026	-0.67
cg25721451	MEIS1	0.0013	-0.68	0.083	-0.43	0.0022	-0.69	0.011	-0.59
cg01406988	MEIS1	0.0021	-0.66	0.10	-0.41	0.0072	-0.64	0.017	-0.56
cg00288327	HOXA1	0.0012	-0.69	0.018	-0.54	0.025	-0.56	0.0071	-0.62
cg15218775	HOXA1	0.0011	-0.69	0.0097	-0.60	0.033	-0.53	0.0048	-0.64
cg03700462	HOXA1	0.0012	-0.68	0.011	-0.59	0.045	-0.50	0.009	-0.60
cg26744375	HOXA1	0.0012	-0.69	0.016	-0.56	0.033	-0.53	0.01	-0.59
cg04167903	HOXA1	0.002	-0.66	0.018	-0.55	0.044	-0.50	0.017	-0.56
cg06715976	HOXA1	0.019	-0.54	0.12	-0.39	0.24	-0.33	0.16	-0.36
cg02978421	HOXA1	0.055	-0.46	0.18	-0.35	0.23	-0.33	0.17	-0.35
cg26069745	HOXA2	0.25	-0.30	0.58	-0.17	0.37	-0.26	0.50	-0.19
cg06055873	HOXA2	0.56	-0.15	0.88	0.05	0.71	-0.11	0.95	0.02
cg20747380	HOXA2	0.04	-0.49	0.098	-0.41	0.087	-0.45	0.078	-0.45
cg23979631	HOXA2	0.97	-0.01	0.94	0.03	0.76	0.09	0.70	0.11
cg24058604	HOXA2	0.59	0.14	0.69	0.13	0.27	0.31	0.35	0.25
cg05921905	HOXA2	0.81	0.07	0.71	0.12	0.67	0.13	0.64	0.14
cg06769202	HOXA2	0.76	0.09	0.51	0.20	0.71	0.11	0.49	0.20
cg02979457	HOXA2	0.95	-0.02	0.82	0.08	0.77	0.08	0.71	0.11
cg09591524	HOXA3	0.47	-0.19	0.71	-0.12	0.36	-0.27	0.53	-0.18
cg02439266	HOXA3	0.83	-0.06	0.77	-0.09	0.54	-0.18	0.47	-0.21
cg09144964	HOXA3	0.31	0.27	0.36	0.25	0.53	0.19	0.38	0.24
cg07522913	HOXA3	0.55	-0.16	0.85	-0.07	0.64	-0.14	0.83	-0.07
cg02693607	HOXA3	0.78	-0.08	0.86	-0.06	0.77	-0.08	0.89	-0.04
cg25768734	HOXA3	0.17	0.35	0.59	0.16	0.37	0.26	0.21	0.33
cg00040268	HOXA3	0.44	0.21	0.63	0.15	0.53	0.19	0.62	0.14
cg05851442	HOXA3	0.64	0.12	0.86	0.06	0.67	0.13	0.55	0.17
cg01301319	HOXA3	0.83	-0.06	0.73	-0.11	0.86	-0.05	0.65	-0.13
cg22962123	HOXA3	0.38	0.24	0.57	0.17	0.43	0.23	0.35	0.26
cg13172549	HOXA3	0.35	0.25	0.42	0.23	0.23	0.33	0.04	0.50
cg08101036	HOXA3	0.90	-0.04	0.96	-0.01	0.68	-0.12	0.82	-0.07
cg00921266	HOXA3	0.49	-0.18	0.69	-0.13	0.31	-0.29	0.42	-0.23
cg07061298	HOXA3	0.001	0.70	0.0038	0.66	0.0066	0.64	0.011	0.59
cg26127662	HOXA3	0.17	0.35	0.045	0.48	0.54	0.18	0.31	0.28
cg07942135	HOXA3	0.47	-0.19	0.88	-0.05	0.37	-0.26	0.50	-0.19
cg07917150	HOXA3	0.12	-0.39	0.33	-0.27	0.10	-0.43	0.21	-0.33
cg10794257	HOXA3	0.092	0.42	0.019	0.54	0.17	0.37	0.12	0.40
cg08164294	HOXA3	0.023	0.53	0.058	0.46	0.0057	0.65	0.038	0.51
cg00899400	HOXA3	0.37	0.24	0.32	0.27	0.60	0.16	0.32	0.28
cg03650946	HOXA3	0.13	0.38	0.16	0.36	0.38	0.25	0.20	0.34
cg09469665	HOXA3	0.11	-0.39	0.19	-0.34	0.13	-0.40	0.13	-0.39
cg21556281	HOXA3	0.79	-0.08	0.67	0.13	0.60	-0.16	0.94	0.02
cg16644023	HOXA3	0.91	0.03	0.92	0.04	0.72	0.10	0.98	0.01
cg15982700	HOXA3	0.13	0.38	0.13	0.39	0.20	0.36	0.13	0.39
cg00318947	HOXA3	0.18	0.35	0.22	0.32	0.65	0.14	0.38	0.24
cg16748008	HOXA3	0.90	0.04	0.98	-0.01	0.79	0.07	0.86	0.05
cg16406967	HOXA3	0.98	0.01	0.98	0.01	0.76	-0.09	0.84	-0.05

Résultats

Illumina ID	Gene Name	hsa-miR-196b-5p (serum)		hsa-miR-10a-3p (serum)		hsa-miR-196b-5p (cell)		hsa-miR-10a-3p (cell)	
		q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic
cg18680977	HOXA3	0.38	-0.24	0.58	-0.17	0.24	-0.32	0.34	-0.26
cg04351734	HOXA3	0.46	0.20	0.54	0.18	0.43	0.23	0.37	0.25
cg22798849	HOXA3	0.47	-0.19	0.61	-0.16	0.23	-0.33	0.31	-0.28
cg19999161	HOXA3	0.11	-0.40	0.21	-0.33	0.15	-0.39	0.12	-0.40
cg21134232	HOXA3	0.31	-0.27	0.37	-0.25	0.23	-0.33	0.27	-0.30
cg01027532	HOXA3	0.0047	0.62	0.0036	0.66	0.024	0.56	0.0071	0.62
cg02000808	HOXA3	0.00016	0.76	0.0014	0.71	0.00056	0.75	0.001	0.71
cg02627455	HOXA3	0.085	0.42	0.027	0.51	0.32	0.28	0.13	0.39
cg12305431	HOXA3	0.67	0.11	0.77	0.09	0.85	0.05	0.83	0.06
cg24272697	HOXA3	0.91	-0.03	0.91	0.04	0.46	-0.21	0.83	-0.06
cg23876203	HOXA3	0.76	-0.08	0.71	-0.12	0.81	-0.07	0.66	-0.12
cg20712820	HOXA3	0.49	-0.18	0.54	-0.18	0.30	-0.29	0.48	-0.20
cg24469729	HOXA3	0.38	0.24	0.14	0.38	0.71	0.11	0.62	0.14
cg07094847	HOXA3	0.59	-0.14	0.91	-0.04	0.45	-0.22	0.60	-0.15
cg20688917	HOXA3	0.097	0.41	0.16	0.36	0.35	0.27	0.16	0.36
cg06837799	HOXA3	0.90	-0.04	0.71	0.12	0.48	-0.21	0.50	-0.19
cg09798023	HOXA3	0.32	0.27	0.51	0.20	0.77	0.08	0.32	0.27
cg00431187	HOXA3	0.33	0.26	0.27	0.30	0.87	0.04	0.50	0.19
cg26297005	HOXA3	0.43	-0.21	0.62	-0.15	0.36	-0.26	0.45	-0.22
cg04778178	HOXA3	0.10	-0.41	0.19	-0.34	0.12	-0.41	0.10	-0.42
cg18430152	HOXA3	0.46	-0.20	0.77	0.09	0.60	-0.16	0.84	-0.05
cg19817912	HOXA3	0.21	0.32	0.33	0.27	0.53	0.19	0.30	0.29
cg19240213	HOXA3	0.027	0.51	0.22	0.32	0.048	0.50	0.12	0.40
cg03331474	HOXA3	0.39	0.23	0.59	0.17	0.27	0.31	0.35	0.25
cg03536885	HOXA3	0.88	-0.05	0.84	-0.07	0.67	-0.13	0.80	-0.08
cg24360871	HOXA3	0.55	0.16	0.61	0.16	0.49	0.20	0.66	0.13
cg22772747	HOXA3	0.96	0.01	0.98	-0.01	0.69	-0.12	0.70	-0.11
cg24361385	HOXA3	0.04	0.49	0.037	0.49	0.23	0.33	0.13	0.39
cg14573448	HOXA3	0.00031	0.73	0.0027	0.67	0.00013	0.80	0.001	0.72
cg25426743	HOXA3	0.68	0.11	0.33	0.27	0.98	-0.01	0.62	0.14
cg07317062	HOXA4	0.018	0.54	0.074	0.44	0.044	0.50	0.026	0.53
cg19142026	HOXA4	0.092	0.42	0.19	0.34	0.20	0.35	0.091	0.43
cg11410718	HOXA4	0.0079	0.59	0.019	0.54	0.02	0.57	0.0099	0.59
cg16651126	HOXA4	0.20	0.33	0.22	0.32	0.46	0.22	0.13	0.39
cg11015251	HOXA4	0.17	0.35	0.19	0.34	0.38	0.25	0.09	0.43
cg25866143	HOXA5	0.38	0.24	0.015	0.56	0.75	0.09	0.13	0.38
cg09549073	HOXA5	0.96	-0.01	0.62	0.15	0.88	-0.04	0.98	-0.01
cg01370449	HOXA5	0.38	0.24	0.016	0.56	0.69	0.11	0.14	0.38
cg04863892	HOXA5	0.41	0.23	0.011	0.59	0.67	0.13	0.15	0.37
cg19759481	HOXA5	0.32	0.27	0.011	0.58	0.67	0.13	0.12	0.40
cg12128839	HOXA5	0.32	0.27	0.013	0.57	0.69	0.12	0.16	0.36
cg04265576	HOXA6	0.59	0.14	0.33	0.27	0.73	0.10	0.54	0.17
cg12810523	HOXA6	0.68	0.11	0.37	0.25	0.76	0.09	0.59	0.16
cg03529432	HOXA6	0.46	-0.20	0.92	-0.03	0.43	-0.23	0.65	-0.13
cg22469274	HOXA6	0.52	-0.17	0.92	0.03	0.59	-0.16	0.84	-0.05
cg17994139	HOXA6	0.45	-0.20	0.92	0.04	0.46	-0.22	0.81	-0.07
cg14044640	HOXA6	0.44	-0.21	0.85	0.06	0.46	-0.21	0.83	-0.06
cg07302069	HOXA7	0.12	-0.39	0.59	-0.17	0.29	-0.30	0.30	-0.28
cg20293594	HOXA7	0.28	-0.29	0.85	-0.07	0.46	-0.22	0.50	-0.19
cg05471296	HOXA7	0.030	-0.51	0.36	-0.25	0.11	-0.42	0.14	-0.38
cg15797110	HOXA7	0.026	-0.52	0.40	-0.23	0.077	-0.46	0.12	-0.40
cg09017619	HOXA7	0.058	-0.46	0.64	-0.14	0.11	-0.42	0.31	-0.28

Résultats

Illumina ID	Gene Name	hsa-miR-196b-5p (serum)		hsa-miR-10a-3p (serum)		hsa-miR-196b-5p (cell)		hsa-miR-10a-3p (cell)	
		q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic
cg05743885	HOXA7	0.031	-0.50	0.26	-0.30	0.077	-0.46	0.14	-0.38
cg19153763	HOXA7	0.016	-0.55	0.16	-0.36	0.056	-0.49	0.11	-0.41
cg07778029	HOXA9	5.36E-05	-0.79	0.0052	-0.64	0.025	-0.56	0.0016	-0.69
cg20741169	HOXA9	9.72E-07	-0.87	0.00064	-0.74	0.00087	-0.73	3.49E-05	-0.83
cg05065989	HOXA9	3.46E-05	-0.80	0.010	-0.60	0.0015	-0.71	0.00092	-0.72
cg16104915	HOXA9	6.29E-06	-0.84	0.011	-0.59	0.00055	-0.75	0.0013	-0.70
cg18447772	HOXA9	1.07E-05	-0.83	0.0054	-0.64	0.00029	-0.78	0.00038	-0.75
cg12600174	HOXA9	4.65E-07	-0.89	0.0021	-0.69	9.70E-05	-0.81	0.00014	-0.79
cg21001184	HOXA9	1.75E-06	-0.86	0.0022	-0.69	0.00028	-0.78	0.00028	-0.76
cg18311537	MIR196B	1.07E-05	-0.83	0.0016	-0.70	0.0052	-0.66	0.00017	-0.78
cg15912800	MIR196B	9.91E-07	-0.87	0.00048	-0.76	0.00065	-0.74	3.60E-05	-0.83
cg26259537	MIR196B	3.52E-06	-0.85	0.012	-0.58	0.0014	-0.71	0.0018	-0.69
cg05250768	MIR196B	0.13	-0.38	0.75	-0.10	0.39	-0.25	0.42	-0.23
cg01024168	MIR196B	2.08E-06	-0.86	0.0068	-0.63	0.00087	-0.73	0.00062	-0.74
cg14780416	MIR196B	0.0016	-0.67	0.078	-0.44	0.036	-0.52	0.01	-0.59
cg05027336	MIR196B	0.0037	-0.63	0.080	-0.43	0.094	-0.44	0.025	-0.54
cg18243072	HOXA10	8.63E-07	-0.88	0.00064	-0.74	0.0015	-0.71	0.0001	-0.80
cg01397139	HOXA10	0.00025	-0.74	0.0097	-0.60	0.032	-0.54	0.0041	-0.65
cg16967880	HOXA10	4.60E-05	-0.79	0.0038	-0.66	0.0077	-0.63	0.00092	-0.72
cg16857858	HOXA10	0.00076	-0.71	0.026	-0.52	0.033	-0.53	0.0084	-0.61
cg18416576	HOXA10	1.07E-05	-0.83	0.011	-0.59	0.0036	-0.67	0.0015	-0.70
cg14625175	HOXA10	1.75E-06	-0.86	0.0023	-0.68	0.00056	-0.75	0.00015	-0.79
cg01215762	HOXA10	3.35E-06	-0.85	0.0027	-0.67	0.0045	-0.66	0.00039	-0.75
cg05210501	HOXA10	0.23	-0.31	0.33	-0.27	0.24	-0.33	0.32	-0.27
cg00870179	HOXA10	0.41	-0.22	0.95	0.02	0.40	-0.24	0.70	-0.11
cg17047659	HOXA10	0.24	-0.31	0.84	-0.07	0.38	-0.25	0.42	-0.23
cg05092861	HOXA10	0.48	-0.19	0.71	-0.11	0.49	-0.20	0.45	-0.21
cg01078824	HOXA10	0.45	-0.20	0.67	-0.13	0.46	-0.21	0.53	-0.18
cg05517976	HOXA10	0.48	-0.19	0.92	-0.04	0.50	-0.20	0.66	-0.13
cg08479590	HOXA11	0.0053	-0.61	0.020	-0.54	0.019	-0.58	0.0064	-0.63
cg21447117	HOXA11	0.0084	-0.59	0.011	-0.58	0.13	-0.40	0.011	-0.59
cg18977999	HOXA11	0.00012	-0.76	0.00064	-0.74	0.0068	-0.64	4.41E-05	-0.82
cg24932686	HOXA11	0.0026	-0.65	0.011	-0.59	0.10	-0.43	0.0089	-0.60
cg14922886	HOXA13	0.011	-0.57	0.015	-0.56	0.018	-0.58	0.0031	-0.66
cg19559519	HOXA13	0.023	-0.53	0.018	-0.54	0.019	-0.58	0.0086	-0.61
cg26512254	HOXA13	0.26	-0.30	0.0079	-0.61	0.25	-0.32	0.068	-0.46
cg04739729	PBX3	0.0078	-0.59	0.021	-0.53	0.082	-0.45	0.0094	-0.60
cg06854084	NKX2-3	1.98E-07	-0.91	0.00029	-0.79	3.72E-05	-0.84	1.35E-05	-0.86
cg05949800	NKX2-3	0.0021	-0.66	0.019	-0.54	0.044	-0.50	0.063	-0.46
cg20521527	NKX2-3	0.017	-0.55	0.018	-0.54	0.082	-0.45	0.058	-0.47
cg05432973	NKX2-3	0.00015	-0.76	0.0011	-0.72	0.028	-0.55	0.0038	-0.65
cg27091380	NKX2-3	3.46E-05	-0.80	0.00019	-0.81	0.0093	-0.62	0.00011	-0.80
cg04645567	NKX2-3	1.47E-06	-0.87	0.00019	-0.80	0.00086	-0.73	1.70E-05	-0.85
cg08287265	NKX2-3	3.40E-07	-0.90	0.00036	-0.77	0.00056	-0.75	2.05E-05	-0.84
cg24948406	HOXB1	0.95	0.02	0.92	0.04	0.74	-0.10	0.82	0.07
cg26634219	HOXB1	0.057	0.46	0.13	0.38	0.18	0.37	0.086	0.44
cg05726756	HOXB1	0.40	0.23	0.77	0.09	0.80	0.07	0.83	0.06
cg17233506	HOXB1	0.42	0.22	0.62	0.15	0.86	0.05	0.54	0.17
cg24900666	HOXB1	0.24	0.31	0.54	0.19	0.66	0.13	0.48	0.20
cg26687072	HOXB1	0.027	0.51	0.011	0.59	0.078	0.46	0.025	0.54
cg22660933	HOXB1	0.85	0.05	0.62	0.15	0.53	-0.18	0.59	-0.16
cg08076955	HOXB1	0.55	-0.16	0.42	-0.23	0.40	-0.24	0.31	-0.28

Résultats

Illumina ID	Gene Name	hsa-miR-196b-5p (serum)		hsa-miR-10a-3p (serum)		hsa-miR-196b-5p (cell)		hsa-miR-10a-3p (cell)	
		q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic
cg26841048	HOXB2	4.66E-07	-0.89	0.00016	-0.83	1.57E-05	-0.86	9.18E-07	-0.90
cg09313705	HOXB2	3.33E-08	-0.93	0.00012	-0.84	3.45E-06	-0.90	5.60E-09	-0.95
cg22777724	HOXB2	4.56E-06	-0.84	0.00033	-0.78	9.73E-05	-0.81	9.18E-07	-0.90
cg22807449	HOXB2	4.93E-07	-0.89	0.00019	-0.81	8.61E-06	-0.88	1.00E-07	-0.92
cg23530553	HOXB2	1.07E-05	-0.82	0.00029	-0.79	0.00017	-0.79	1.84E-05	-0.85
cg21872782	HOXB3	0.65	0.12	0.76	0.10	0.76	-0.09	0.48	-0.20
cg21399057	HOXB3	0.045	0.48	0.32	0.28	0.066	0.47	0.15	0.37
cg21474786	HOXB3	0.44	-0.21	0.34	-0.26	0.51	-0.19	0.35	-0.26
cg15255390	HOXB3	0.83	-0.06	0.74	-0.10	0.68	-0.12	0.64	-0.13
cg03260240	HOXB3	0.42	0.22	0.19	0.34	0.65	0.14	0.62	0.14
cg24095592	HOXB3	0.49	0.18	0.26	0.30	0.67	0.13	0.57	0.16
cg23551720	HOXB3	0.12	-0.39	0.11	-0.40	0.10	-0.43	0.050	-0.48
cg24241823	HOXB3	0.43	-0.21	0.45	-0.22	0.20	-0.35	0.23	-0.32
cg23507953	HOXB3	0.33	-0.26	0.54	-0.18	0.13	-0.40	0.12	-0.40
cg12570134	HOXB3	0.041	-0.48	0.024	-0.52	0.10	-0.43	0.020	-0.55
cg09952002	HOXB3	0.24	0.30	0.22	0.32	0.58	0.17	0.32	0.27
cg20152430	HOXB3	0.037	-0.49	0.44	-0.22	0.058	-0.48	0.25	-0.31
cg13479204	HOXB3	0.56	-0.15	0.92	0.03	0.75	-0.09	0.83	0.06
cg03602288	HOXB3	0.32	-0.27	0.92	-0.03	0.53	-0.18	0.80	-0.08
cg01629240	HOXB3	0.28	-0.29	0.96	-0.02	0.45	-0.22	0.83	-0.06
cg05323879	HOXB3	0.55	-0.16	0.94	0.03	0.59	-0.16	0.89	0.04
cg25032089	HOXB3	0.11	-0.40	0.036	-0.50	0.092	-0.44	0.038	-0.50
cg11862714	HOXB3	0.84	-0.06	0.74	-0.11	0.79	-0.07	0.70	-0.11
cg07850987	HOXB3	0.22	-0.32	0.30	-0.28	0.27	-0.31	0.11	-0.41
cg19104015	HOXB3	0.47	-0.19	0.52	-0.19	0.68	-0.12	0.26	-0.31
cg02749463	HOXB3	0.41	-0.22	0.31	-0.28	0.79	-0.07	0.35	-0.26
cg01990102	HOXB3	0.60	-0.14	0.67	-0.13	0.95	-0.02	0.50	-0.19
cg01593673	HOXB3	0.11	-0.39	0.11	-0.40	0.28	-0.30	0.091	-0.43
cg23014425	HOXB3	0.0067	-0.60	0.016	-0.56	0.036	-0.52	0.0093	-0.60
cg04800503	HOXB3	0.0030	-0.65	0.011	-0.59	0.020	-0.57	0.0049	-0.64
cg06186155	HOXB3	0.0047	-0.62	0.017	-0.55	0.028	-0.55	0.0085	-0.61
cg00524443	HOXB3	0.16	-0.36	0.088	-0.42	0.21	-0.34	0.086	-0.44
cg10165801	HOXB3	0.031	-0.50	0.076	-0.44	0.037	-0.52	0.0062	-0.63
cg06395298	HOXB3	0.018	-0.54	0.045	-0.48	0.024	-0.56	0.0078	-0.61
cg22053945	HOXB3	0.0059	-0.61	0.013	-0.57	0.035	-0.52	0.0086	-0.61
cg12910797	HOXB3	0.0045	-0.62	0.016	-0.56	0.029	-0.55	0.0080	-0.61
cg24761525	HOXB3	0.0067	-0.60	0.022	-0.53	0.033	-0.53	0.0071	-0.62
cg13293524	HOXB3	0.0079	-0.59	0.018	-0.55	0.037	-0.52	0.0095	-0.60
cg04117801	HOXB3	0.0053	-0.61	0.016	-0.56	0.033	-0.53	0.0085	-0.61
cg00842549	HOXB3	0.11	-0.40	0.13	-0.39	0.19	-0.36	0.075	-0.45
cg24767968	HOXB3	0.0041	-0.63	0.011	-0.59	0.023	-0.56	0.0049	-0.64
cg24963001	HOXB3	0.039	-0.49	0.017	-0.55	0.12	-0.41	0.026	-0.53
cg13789775	HOXB4	6.96E-06	-0.84	0.0099	-0.60	0.00013	-0.80	0.00046	-0.75
cg04609859	HOXB4	7.57E-06	-0.83	0.0020	-0.69	0.00035	-0.77	0.00017	-0.78
cg02422694	HOXB4	4.31E-07	-0.90	0.00094	-0.73	7.89E-06	-0.88	1.84E-05	-0.85
cg19081437	HOXB4	5.02E-06	-0.84	0.0040	-0.65	0.00011	-0.81	0.00021	-0.77
cg26327071	HOXB4	1.40E-05	-0.82	0.0057	-0.64	0.00056	-0.75	0.0017	-0.69
cg24114154	HOXB4	6.09E-07	-0.88	0.00033	-0.77	3.72E-05	-0.84	1.99E-05	-0.84
cg12806763	HOXB4	4.66E-07	-0.89	0.00044	-0.76	4.54E-05	-0.83	3.74E-05	-0.83
cg26916621	MIR10A	0.00012	-0.77	0.00064	-0.74	0.0066	-0.64	0.00021	-0.77
cg15649236	MIR10A	0.0069	-0.60	0.0070	-0.62	0.078	-0.46	0.0018	-0.69
cg03809346	HOXB5	0.0012	-0.69	0.0079	-0.61	0.032	-0.54	0.0087	-0.60

Résultats

Illumina ID	Gene Name	hsa-miR-196b-5p (serum)		hsa-miR-10a-3p (serum)		hsa-miR-196b-5p (cell)		hsa-miR-10a-3p (cell)	
		q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic
cg05085809	HOXB5	0.59	0.14	0.54	0.19	0.20	0.35	0.30	0.29
cg06266993	HOXB5	0.0017	-0.67	0.0077	-0.62	0.012	-0.61	0.0016	-0.69
cg06384413	HOXB5	0.018	-0.54	0.22	-0.32	0.016	-0.59	0.055	-0.48
cg11155697	HOXB5	1.26E-05	-0.82	0.00039	-0.77	0.00043	-0.76	3.91E-05	-0.82
cg02712075	HOXB5	0.057	-0.46	0.026	-0.52	0.18	-0.37	0.022	-0.55
cg10153335	HOXB5	0.0037	-0.64	0.0020	-0.69	0.011	-0.61	0.00097	-0.72
cg02293936	HOXB5	0.0030	-0.64	0.0074	-0.62	0.032	-0.53	0.0012	-0.71
cg11850549	HOXB6	0.0072	-0.60	0.012	-0.58	0.10	-0.43	0.0029	-0.67
cg01324550	HOXB6	0.00053	-0.72	0.0070	-0.62	0.029	-0.54	0.0015	-0.70
cg15908709	HOXB6	0.00016	-0.75	0.0068	-0.63	0.0066	-0.64	0.0016	-0.69
cg08832695	HOXB6	4.01E-05	-0.80	0.00033	-0.78	0.0018	-0.70	0.00011	-0.80
cg23217463	HOXB6	0.21	-0.32	0.12	-0.39	0.20	-0.35	0.074	-0.45
cg05490023	HOXB6	0.0046	-0.62	0.011	-0.59	0.023	-0.56	0.0071	-0.62
cg24889708	HOXB6	0.28	-0.29	0.22	-0.33	0.32	-0.28	0.15	-0.37
cg14509967	HOXB6	0.97	-0.01	0.94	-0.02	0.98	0.01	0.62	-0.14
cg02566861	HOXB6	0.42	0.22	0.46	0.21	0.25	0.32	0.51	0.19
cg09983216	HOXB6	0.17	0.35	0.16	0.36	0.10	0.43	0.078	0.45
cg21816532	HOXB6	0.00073	0.71	0.00049	0.75	0.0071	0.64	0.00059	0.74
cg21387752	HOXB6	0.015	0.56	0.0015	0.71	0.011	0.61	0.0019	0.68
cg01723934	HOXB6	0.057	0.46	0.018	0.55	0.25	0.32	0.033	0.52
cg00072689	HOXB6	0.00012	0.76	0.00064	0.74	0.0011	0.72	0.00011	0.80
cg15435170	HOXB6	0.0017	0.67	0.0026	0.68	0.0093	0.62	0.0010	0.72
cg01986016	HOXB6	0.00068	0.71	0.0016	0.70	0.010	0.62	0.00043	0.75
cg20471691	HOXB6	0.013	0.56	0.031	0.51	0.037	0.52	0.0061	0.63
cg17179862	HOXB6	0.18	0.34	0.044	0.48	0.41	0.24	0.092	0.43
cg03803541	HOXB6	0.063	0.45	0.011	0.59	0.20	0.35	0.036	0.51
cg16848873	HOXB6	0.019	0.54	0.011	0.59	0.18	0.36	0.023	0.54
cg05888755	HOXB6	0.0021	0.66	0.0074	0.62	0.029	0.54	0.0044	0.65
cg10906729	HOXB6	0.14	0.37	0.019	0.54	0.38	0.25	0.096	0.42
cg18684142	HOXB6	0.13	0.38	0.026	0.52	0.37	0.26	0.092	0.43
cg02574073	HOXB6	0.10	0.41	0.013	0.57	0.29	0.30	0.088	0.43
cg19828220	HOXB6	0.031	0.50	0.0088	0.61	0.16	0.38	0.029	0.52
cg06493080	HOXB7	8.26E-05	-0.78	0.011	-0.59	0.00097	-0.73	0.0016	-0.70
cg06856188	HOXB7	5.36E-05	-0.79	0.0029	-0.67	0.00084	-0.73	0.00015	-0.79
cg17584085	HOXB7	0.00088	-0.70	0.0064	-0.63	0.0028	-0.68	0.00034	-0.76
cg20510845	HOXB7	0.60	-0.14	0.73	-0.11	0.87	0.04	0.98	0.01
cg24973150	HOXB7	0.20	-0.33	0.33	-0.27	0.50	-0.20	0.29	-0.29
cg11149743	HOXB7	0.19	-0.34	0.38	-0.24	0.55	-0.18	0.52	-0.18
cg09998632	HOXB7	8.52E-05	-0.77	0.0037	-0.66	0.00055	-0.76	0.00098	-0.72
cg17468987	HOXB7	7.09E-05	-0.78	0.015	-0.56	0.00035	-0.77	0.0038	-0.65
cg09357097	HOXB7	6.09E-07	-0.88	0.00065	-0.74	5.44E-05	-0.83	3.91E-05	-0.82
cg22913933	HOXB8	0.62	-0.13	0.60	0.16	0.83	-0.06	0.94	-0.02
cg15539420	HOXB8	0.027	-0.51	0.16	-0.36	0.12	-0.41	0.078	-0.45
cg27464311	HOXB8	0.39	-0.23	0.96	-0.02	0.68	-0.12	0.62	-0.14
cg10505324	HOXB8	0.60	-0.14	0.92	0.03	0.98	-0.01	0.84	-0.06
cg25116388	HOXB8	0.00010	-0.77	0.0015	-0.71	0.0032	-0.68	0.00045	-0.75
cg27294582	HOXB8	0.0017	-0.67	0.0044	-0.65	0.012	-0.61	0.0010	-0.71
cg00135852	HOXB9	0.0094	-0.58	0.016	-0.55	0.056	-0.49	0.0050	-0.64
cg12370791	HOXB9	0.023	-0.53	0.098	-0.41	0.12	-0.41	0.055	-0.48
cg10633363	HOXB9	4.31E-07	-0.90	0.00019	-0.80	6.86E-05	-0.82	7.57E-06	-0.87
cg03218689	HOXB9	2.02E-06	-0.86	0.00033	-0.77	1.57E-05	-0.86	1.35E-05	-0.86
cg03697136	HOXB9	1.11E-05	-0.82	0.0011	-0.72	0.00056	-0.75	0.00011	-0.80

Résultats

Illumina ID	Gene Name	hsa-miR-196b-5p (serum)		hsa-miR-10a-3p (serum)		hsa-miR-196b-5p (cell)		hsa-miR-10a-3p (cell)	
		q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic	q-value	R-statistic
cg18228282	HOXB9	0.38	-0.24	0.60	-0.16	0.22	-0.34	0.32	-0.27
cg17611765	HOXB9	0.00051	-0.72	0.0021	-0.69	0.013	-0.60	0.00058	-0.74
cg13643585	HOXB9	0.047	-0.47	0.026	-0.52	0.082	-0.45	0.057	-0.47
cg02329038	MIR196A1	0.48	0.19	0.36	0.25	0.44	0.23	0.64	0.14
cg21842478	HOXB13	0.0012	-0.68	0.11	-0.41	0.015	-0.59	0.041	-0.50
cg17457986	HOXB13	0.0044	-0.63	0.1	-0.41	0.033	-0.53	0.048	-0.49
cg18498593	HOXB13	2.46E-06	-0.86	0.00057	-0.75	0.00087	-0.73	0.00021	-0.77

Illumina_ID, identification number of the Illumina probes on the HM-450 microarray assessing the selected CpG sites; R-statistic, Pearson's correlation coefficient; q-value, p-value of the test adjusted for multiple test

A microscopic view of numerous red blood cells, which are biconcave discs, appearing in shades of pink and red against a dark background. The cells are densely packed and vary in focus, with some in sharp foreground and others blurred in the background.

DISCUSSION

Au cours de cette thèse nous avons pu montrer l'intérêt qu'il pouvait y avoir à étudier les micro-ARN sériques dans les LAM.

1. Nous avons ainsi identifié une signature de micro-ARN sériques spécifique des LAP, dont la majeure partie prenait naissance au niveau de la région DLK1-DIO3 (région soumise à l'empreinte). Ces données sont venues conforter l'étude précédemment menée par Dixon McIver qui se focalisait sur le profilage de micro-ARN cellulaires [76]. Cependant, il est apparu que certains patients atteints de LAP n'exprimaient que faiblement les micro-ARN de la région DLK1-DIO3, aussi bien au niveau sérique que cellulaire. Ainsi ces données suggèrent que la surexpression des micro-ARN de la région 14q32 n'est pas une caractéristique constante et exclusive des patients atteints de LAP. L'étude des patients atypiques, notamment sur un plan épigénétique, devrait apporter un nouvel éclairage sur la régulation de la région DLK1-DIO3 dans les LAM (travail en cours).

2. Nous avons montré que les micro-ARN spécifiques des LAP avaient pour origine les cellules leucémiques, et que pour la plupart d'entre eux, leur niveau d'expression était corrélé aux principaux facteurs pronostiques connus dans ce sous-type de LAM. Il est intéressant de noter que l'expression du CD34 dans les blastes des LAP étaient également associées à un fort niveau d'expression sérique de 11 des 26 micro-ARNs spécifiques des LAP, incluant mir-299-5p et mir-323-3p. Ce résultat pourrait être mis en parallèle avec des études montrant:

(a) dans des modèles murins, que l'activation de la région DLK1-DIO3 était corrélée à la pluripotence des cellules souches [77];

(b) que dans les hépatocarcinomes, l'expression des micro-ARN de la région 14q32 était associée à une signature de cellules souches et à un plus mauvais pronostic [78];

(c) que hsa-mir-299-5p et hsa-mir-323-3p pouvaient réguler l'activité du complexe répresseur PRC2 (polycomb repressive complex 2) dans les cellules souches embryonnaires de souris [79].

Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle un haut niveau d'expression des micro-ARN de la région DLK1-DIO3 serait le reflet d'un phénotype de LAP plus immature, puisqu'exprimant le marqueur CD34 plus fréquemment, et plus agressif (leucocytose, temps de prothrombine au diagnostic, mutation de *FLT3*).

Il serait intéressant de déterminer s'il existe un effet paracrine de ces micro-ARN circulants, qui, par le biais d'une boucle d'amplification intercellulaire pourrait accroître les perturbations cellulaires et clinico-biologiques observées parfois létales dans ce sous-type de LAM [80]. Si cela est le cas, ceci pourrait amener à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de LAP hautement prolifératives pour qui le pronostic à court terme est engagé. Enfin, toujours pour ces patients atteints de LAP, il serait intéressant d'évaluer la valeur pronostique de l'expression sérique des micro-ARN de la région DLK1-DIO3, notamment de hsa-mir-299-5p et hsa-mir-323-3p, sur une cohorte de patients traités de façon homogène au sein d'un essai prospectif du groupe européen APL (si toutefois des échantillons de sérums sont disponibles).

3. Nous avons mis en évidence que hsa-miR-10a-3p et hsa-miR-196b-5p étaient surexprimés dans le sérum des patients atteints de LAM à caryotype normal avec une mutation de *NPM1* et/ou une *FLT3-ITD*; et cela en comparaison des niveaux d'expression de ces deux micro-ARNs chez des patients atteints de LAM à caryotype favorable. Ces micro-ARN avaient aussi pour origine les cellules leucémiques. Le fait que le niveau d'expression sérique de ces deux micro-ARN n'était pas corrélé à la leucocytose observée au diagnostic chez ces patients, suggère que leur présence dans le sérum n'était pas due à une lyse des blastes, mais plutôt à

un mécanisme actif. Des investigations complémentaires seront nécessaires pour valider cette hypothèse. Ceci est d'autant plus intéressant que *NPM1* a été identifié comme une protéine impliquée dans l'export cellulaire actif de micro-ARN [81].

Il faut aussi noter que ces deux micro-ARN n'étaient pas surexprimés dans les LAM à caryotype normal sans mutation de *NPM1* et de *FLT3*. Une recherche de mutations spécifique de l'un de ces deux sous-groupes de LAM à caryotype normal est en cours pour essayer de mieux préciser les mécanismes responsables de cette différence. Le fait que cette surexpression soit observée chez les patients mutés pour *NPM1* et/ou pour *FLT3*, - comme l'a rapporté Cammarata et al. dans une étude portant sur du profiling de micro-ARN cellulaires [82] -, laisse à penser que l'anomalie pourrait se situer au niveau des patients n'ayant aucune des mutations de *NPM1* et *FLT3*. En ce sens, les gènes *IDH1* et *IDH2* pourraient être les deux gènes candidats expliquant ce différentiel d'expression pour ces micro-ARN et les gènes *HOX* et *TALE* associés. En effet, des premiers résultats de séquençage haut-débit ont mis en évidence chez les trois patients avec une LAM à caryotype normal sans mutation de *NPM1* et de *FLT3*-ITD, une mutation d'*IDH2* (COSM33733; p.R172K ou c.515G>A); ce qui est étonnamment élevé en terme de fréquence pour ce mutant chez ce type de patients. Les autres patients atteints de LAM à caryotype normal avec mutation de *NPM1* et/ou *FLT3*-ITD sont en cours de séquençage.

4. Nous avons aussi observés que le niveau d'expression sérique de hsa-miR-10a-3p et hsa-miR-196b-5p était significativement plus élevé chez les patients ayant une LAM à caryotype normal avec mutation de *NPM1* et/ou un *FLT3*-ITD que chez des volontaires sains. Ces données suggèrent que ces deux micro-ARN pourraient servir de base à une nouvelle approche d'évaluation de la maladie résiduelle dans les LAM exprimant ceux-ci. Cette approche basée sur l'étude du sérum pourrait être particulièrement utile lorsqu'aucun

marqueur informatif pour la maladie résiduelle n'est disponible chez un patient, ou bien quand l'obtention de cellules d'intérêt n'est possible et qu'une rechute est suspectée, notamment devant une ou plusieurs cytopénies inexplicables et prolongées. Ce travail est en cours et une réponse à la question posée devrait être disponible rapidement.

5. Avec un objectif plus mécanistique, nous avons montré que les expressions sérique et cellulaire de hsa-miR-196-5p et hsa-miR-10a-3p étaient associées à une activation transcriptionnelle large des loci HOXA et HOXB ainsi que des gènes associés, *MEIS1* et *PBX3*. Nous avons aussi observé que cette image transcriptionnelle était à mettre en miroir de celle obtenue par l'analyse du méthylome de ces gènes. L'approche pangénomique utilisée a ainsi permis d'émettre l'hypothèse d'une transcription étroitement coordonnée entre ces différents gènes. *MEIS1*, pourrait, au sein de ceux-ci avoir un rôle plus important de coordination puisqu'il code un cofacteur essentiel de *HOXA9* et *HOXB3*, c'est-à-dire des deux gènes HOX les plus proches respectivement de hsa-miR-196b et de hsa-miR-10a [14]. Ce travail a aussi permis de suggérer un rôle majeur d'une régulation épigénétique coordonnée par méthylation de l'ADN pour les gènes sus-cités, y compris ceux des micro-ARN, hsa-miR-196-5p et hsa-miR-10a-3p.

6. Enfin, cette étude pangénomique a permis d'identifier *NKX2-3* comme un nouveau gène d'intérêt dans les LAM à caryotype normal, et dont le niveau d'expression était corrélé à celui des gènes des loci HOXA et HOXB, de *MEIS1* et de *PBX3*. Aucune donnée dans la littérature n'a jusqu'à présent permis de lier ce gène à l'hématopoïèse normale ou à la leucémogénèse des LAM. Ce gène paraît d'autant plus important que, dans les LAM à caryotype normal, son niveau d'expression était fortement corrélé à celui de *GFII*, gène clef de l'autorenouveau, de la prolifération et de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques [83, 84] de par la fonction de répresseur transcriptionnel de la protéine qui en découle. Un lien direct

entre ces deux gènes pourrait exister - dans un sens NKX2-3 favorisant la transcription de *GFI1* - puisque une séquence de fixation spécifique des gènes NKX a été mise en évidence au sein des 4000 premières bases en amont de la région 5'UTR de *GFI1* (région promotrice). Nous avons par ailleurs observé que le profil de méthylation de la région promotrice de NKX2-3 était en miroir de son niveau d'expression dans les échantillons de LAM étudiés, suggérant là aussi un rôle clef de la régulation épigénétique par méthylation de l'ADN sur la transcription de ce gène. Le travail se poursuit pour préciser le rôle de ce gène dans les LAM, et notamment les interrelations qui pourraient exister entre celui-ci, *GFI1*, les loci HOXA et HOXB, ainsi que les gènes *MEIS1* et *PBX3*.

A microscopic view of numerous red blood cells, which are biconcave discs, filling the frame. The cells are a reddish-pink color and are arranged in a somewhat disorganized pattern. A black rectangular box is superimposed over the center of the image, containing the word "ANNEXE" in bold, black, uppercase letters.

ANNEXE

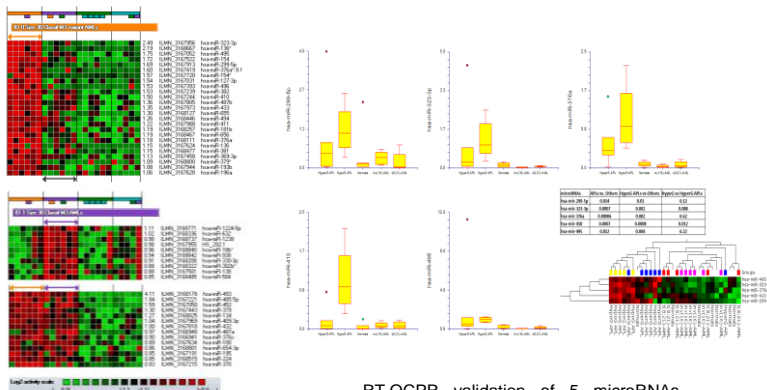
FAB M3-variant acute promyelocytic leukemia display specific plasmatic and cellular microRNA profiles: a microarray-based genomewide study identifying a deregulation of microRNAs involved in megakaryopoiesis and platelet activation.

Estelle Pedrono^{1*}, Odile Blanchet^{1,2}, Diane Raingeard de la Blétière^{1,3}, Anne Coutolleau³, Franck Geneviève², Laurence Baranger⁴, Mathilde Hunault-Berger^{1,5}, Aline Schmidt-Tanguy^{1,5}, Marc Zandecki², Yves Delneste¹, Norbert Ifrah^{1,5} and Philippe Guardiola^{1,3,5}
¹ UMR INSERM 892 – CNRS 6299, LUNAM, Université d'Angers, Angers, France; ² Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France; ³ Plateforme SNP, Transcriptome & Epigénomique, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France; ⁴ Laboratoire de Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France; ⁵ Service des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules participating in post-transcriptional regulation of gene expression. In leukemias, some miRNAs have been considered either as oncogenes or tumor suppressor genes. miRNAs are circulating in the serum in a stable form, leading to consider those as blood based biomarkers for detection and surveillance of malignancies. Limited data are available regarding circulating miRNAs in acute myeloid leukemia (AML). This study aimed at identifying serum miRNAs signatures associated with favorable cytogenetic risk AMLs, including acute promyelocytic leukemia (APL) as well as inv(16)-AMLs and t(8;21)-AMLs.

Material and Methods: miRNAs were extracted from blast cells and serum of 29 AML patients. There were 4 patients with hypergranular APL, 8 patients hypogranular APL, 4 patients with t(8;21)-AMLs, 4 patients with inv(16)-AMLs and 9 NK-AMLs.

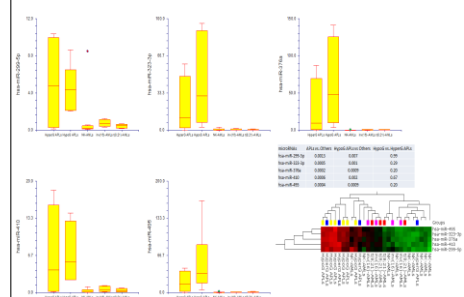
1- Identification of serum-derived miRNAs expression profiles associated with low cytogenetic risk AML subtypes with a microarray-based approach



Class prediction analysis identifying serum microRNAs specifically over-expressed in either hypogranular APLs, hypergranular APLs or both as compared to inv(16)-AMLs and t(8;21)-AMLs.

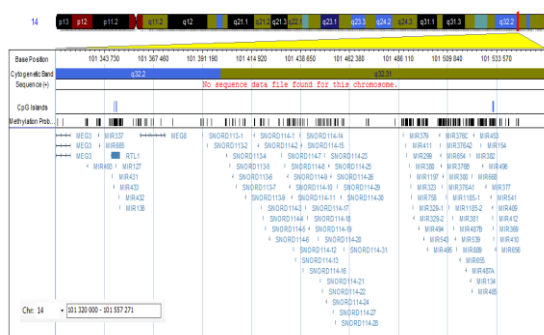
RT-QCPR validation of 5 microRNAs specifically over-expressed in the serum of APLs compared to inv(16)-AMLs, t(8;21)-AMLs and normal controls. Heatmap and hierarchical clustering according to the 5 validated serum microRNAs (bottom right).

2 - These markers originate from the leukemic blasts



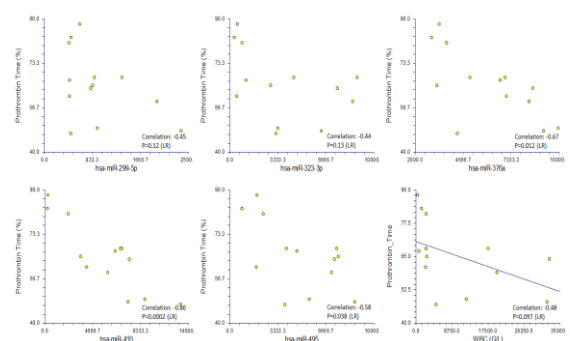
RT-QCPR validation of 5 microRNAs specifically over-expressed in APL blasts compared to inv(16)-AMLs, t(8;21)-AMLs and normal karyotype AMLs (NK-AMLs). Heatmap and hierarchical clustering according to the 5 validated cellular microRNAs (bottom right).

3 - Identified miRNAs are located in the same imprinted locus in 14q32



MicroRNAs identified as being specifically over-expressed in the serum of APL patients at diagnosis are almost all located within the DLK1-DIO3 imprinted locus in 14q32

4 - These circulating miRNAs were reflecting biological abnormalities observed in AML patients.



Correlation between the expression level of APL-specific microRNAs (microarray data) and prothrombin time (%) at diagnosis (APL patients)

Conclusion: Serum miRNAs expression profiling enabled distinguishing hypergranular and hypogranular APLs from inv(16)- and t(8;21)-AMLs. No serum miRNAs were identified as being specifically over-expressed in the serum of inv(16)-AMLs and t(8;21)-AMLs. Most serum APL-specific miRNAs were likely to originate from the leukemic blasts. The APL-specific miRNAs almost all localized in the DLK1-DIO3 imprinted locus in 14q32. Prothrombin time, which is almost always abnormal in APLs at diagnosis, was correlated to the expression levels of some serum APL-specific miRNAs. Their role in disseminated intravascular coagulation deserves further studies.

A microscopic view of numerous red blood cells, which are biconcave discs, filling the frame. The cells are a reddish-pink color and are arranged in a somewhat disorganized pattern. A black rectangular box is superimposed over the center of the image, containing the word 'BIBLIOGRAPHIE' in bold, black, uppercase letters.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Ferrara F and Schiffer CA, *Acute myeloid leukaemia in adults*, Lancet, 2013; 381: 484-95.
- 2 O'Brien and al, *The Epigenetic landscape of Acute Myeloid Leukemia*, Advances in Hematology. 2014.
- 3 Lowenberg B, et al, *Acute myeloid leukemia*³. N Engl J Med. 1999 Sep 30;341(14):1051-62
- 4 Varet B. Livre de l'interne en hématologie. Edition 3. 2012.
- 5 Falini B et al. *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med. 2005; 352: 254–66.
- 6 Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. *Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study*. Cancer Res. 2001; 61: 7233–39.
- 7 Gilliland DG et al. The molecular basis of leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004: 80–97.
- 8 Bacher U et al. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. Curr Opin Oncol. 2010; 22:646–55.
- 9 Shen Y et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2011; 118:5593–603.
- 10 De Braekeleer E et al, *Hox gene dysregulation in acute myeloid leukemia*. Future Oncol. 2014 Feb; 10(3):475-95.
- 11 Awagoe H et al. *Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells*. Leukemia 1999; 13: 687–698.
- 12 Pineault N et al. *Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny*. Exp Hematol 2002; 30: 49–57.
- 13 Alharbi R A et al, *The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia*. Leukemia (2013) 27, 1000–1008.
- 14 Thorsteinsdottir U et al, *Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia*. Mol Cell Biol. 2001 Jan; 21(1):224-34.
- 15 Sheryl M et al, *NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights*. Blood. 2011; 118: 6247-6257.

- 16 Gruber TA et al, *An Inv(16) (p13.3q24.3)-encoded CBFA2T3-GLIS2 fusion protein defines an aggressive subtype of pediatric acute megakaryoblastic*. *Cancer cell*. 2012; 22: 683-697.
- 17 Debernardi S et al. *Genome-wide analysis of acute myeloid leukemia with normal karyotype reveals a unique pattern of homeobox gene expression distinct from those with translocation-mediated fusion events*. *Genes Chrom. Cancer* (2003).37, 149–158.
- 18 Cammarata G et al. *Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia*. *Am. J. Hematol* (2010). 85, 331–339.
- 19 Kocabas F et al, *Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells*. *Blood*. 2012 Dec 13; 120(25):4963-72
- 20 Hillestad L.K, *Acute promyelocytic leukemia*. *Acta Med Scand*. 1957 Nov 29; 159(3):189-94.
- 21 Degos, L. and Wang Z.Y., *All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia*. *Oncogene*. 2001. 20(49):p.7140-5.
- 22 Biondi A et al., *RAR-alpha gene rearrangements as a genetic marker for diagnosis and monitoring in acute promyelocytic leukemia*. *Blood*. 1991.77(7):1418-22.
- 23 De The H et al., *The t(15 ;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus*. *Nature*. 1990.347(6293):558-61.
- 24 De The H et al., *The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR*. *Cell*. 1991. 66(4): 675-84.
- 25 Kakizuka A et al., *Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML*. *Cell*. 1991. 66(4):663-74.
- 26 Warrell R.P Jr. et al, *Acute promyelocytic leukemia*. *N Engl J Med*. 1993. 329(3):177-89.
- 27 Huang ME et al, *Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia*. *Blood*. 1998.72(2):567-72.
- 28 Bernard J et al, [*Acute promyelocytic leukemia: a study made on 20 cases*]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1959. 89:604-8.
- 29 Cordonnier C et al, *Acute promyelocytic leukemia in 57 previously untreated patients*. *Cancer*. 1985. 55(1):18-25.

- 30 Tallman M.S et al, *Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies*. Blood. 2002. 99(3):759-67.
- 31 Avvisati G et al, *Acute promyelocytic leukemia: clinical and morphologic features and prognostic factors*. Semin Hematol. 2001.38:9.4-12.
- 32 De Botton S et al, *Additional chromosomal abnormalities in patients with acute promyelocytic leukaemia (APL) do not confer poor prognosis: results of APL 93 trial*. Br J Haematol. 2000. 111(3):801-6.
- 33 Redner, R.L et al, *The t (5; 17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion*. Blood. 1996. 87(3):882-6.
- 34 Wells, R.A et al, *Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMa, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia*. Nat Genet. 1997. 17(1):109-13.
- 35 Chen Z et al, *Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia*. Embo J. 1993.12(3):1161-7.
- 36 Arnould, C et al, *The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia*. Hum Mol Genet. 1999. 8(9):1741-9.
- 37 Pandolfi, P.P et al., *Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia*. Embo J. 1992. 11(4):1397-407.
- 38 Renneville A et al, *Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature*. Leukemia. 2008. 22(5):915-31.
- 39 Beitinjaneh A et al, *Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: A systematic review*. Leuk Res. 2010 Jul; 34(7):831-6.
- 40 Gilliland D.G. and J.D. Griffin, *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. Blood. 2002. 100(5):1532-42.
- 41 Nakao M et al, *Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia*. Leukemia. 1996. 10(12):1911-8.
- 42 Thiede C et al, *Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis*. Blood. 2002.99(12):4326-35.

- 43 Kuchenbauer F et al, *Impact of FLT3 mutations and promyelocytic leukaemia-breakpoint on clinical characteristics and prognosis in acute promyelocytic leukaemia*. Br J Haematol. 2005. 130(2):196-202.
- 44 Callens C et al, *Prognostic implication of FLT3 and Ras gene mutations in patients with acute promyelocytic leukemia (APL): a retrospective study from the European APL group*. Leukemia. 2005. 19(7):1153-60.
- 45 Paietta E et al, *The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG study*. Leukemia. 1994. 8(7):1108-12.
- 46 Paietta E, *Expression of cell-surface antigens in acute promyelocytic leukaemia*. Best Pract Res Clin Haematol. 2003. 16(3):369-85.
- 47 Foley R et al., *CD34-positive acute promyelocytic leukemia is associated with leukocytosis, microgranular/hypogranular morphology, expression of CD2 and bcr3 isoform*. Am J Hematol. 2001. 67(1):34-41.
- 48 Albano F et al, *The biological characteristics of CD34+ CD2+ adult acute promyelocytic leukemia and the CD34 CD2 hypergranular (M3) and microgranular (M3v) phenotypes*. Haematologica. 2006. 91(3):311-6.
- 49 Biondi A et al., *CD2 expression in acute promyelocytic leukemia is associated with microgranular morphology (FAB M3v) but not with any PML gene breakpoint*. Leukemia. 1995. 9(9):1461-6.
- 50 Lin P et al, *Expression of CD2 in acute promyelocytic leukemia correlates with short form of PML-RARalpha transcripts and poorer prognosis*. Am J Clin Pathol. 2004. 121(3):402-7.
- 51 Lund AH and Van Lohuizen M, *Epigenetics and cancer*, Genes and Development.2004, 18:2315-23335
- 52 Feinberg AP and Tycko B, *The history of cancer epigenetics*, Nature reviews. 2004; 4: 143-153
- 53 Deltour S et al, *Epigenetics and cancer*, Med Sci (Paris). 2005 Apr; 21(4):405-11
- 54 Paldi A and Jami J, *Eléments chromosomiques contrôlant l'empreinte parentale des gènes*. Medecine sciences .1996; 12:189-91
- 55 Da Rocha ST et al, *Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain*. Trends Genet. 2008 Jun; 24(6):306-16.
- 56 Gabory A and Dandolo L. *Epignétique et développement : l'empreinte parentale*. Médecine sciences. 2005 ; 21 :390-5.

- 57 Benetatos L et al, *The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis*, Cell Mol Life Sci. 2013 Mar; 70(5):795-814.
- 58 Manodoro F et al, *Loss of imprinting at the 14q32 domain is associated with microRNA overexpression in acute promyelocytic leukemia*. Blood. 2014 Mar 27; 123(13):2066-74.
- 59 Chung YR and Schatoff E, *Epigenetic alterations in hematopoietic malignancies*. Int J Hematol. 2012; 96:413-427.
- 60 Schoofs T, Müller-Tidow C, *DNA methylation as a pathogenic event and as a therapeutic target in AML*. Cancer Treatment Reviews. 2011 ;(37) S13-S18.
- 61 Jansson MD and Lund AH, *MicroRNA and cancer*, Molecular Oncology.2012, 6:590-610.
- 62 Lee R C et al, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell.1993, vol. 75, no. 5, pp. 843–854.
- 63 Wightman B et al, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell. 1993, vol. 75, no. 5, pp. 855–862.
- 64 Krol J et al, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat rev Genet. 2010; 11(9):597-610.
- 65 Jardin F et al, *Micro-RNA en hématologie*. Hématologie. 2008 ; 14(2) :117-28.
- 66 Schwarzenbach H et al, *Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer*. Nat Rev Clin Oncol. 2014 Mar;11(3):145-56.
- 67 Mitchell PS et al, *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 29; 105(30):10513-8.
- 68 Kroh EM et al, *Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)*. Methods. 2010 Apr; 50(4):298-301.
- 69 Mi S et al. *MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104(50):19971–6.
- 70 Seca H et al, *miR signatures and the role of miRs in acute myeloid leukaemia*. Eur J Cancer. 2010 Jun;46(9):1520-7
- 71 Havelange V et al, *Implications of the miR-10 family in chemotherapy response of NPM1-mutated AML*. Blood. 2014 Apr 10; 123(15):2412-5.

- 72 Schwind S et al, *Prognostic significance of expression of a single microRNA, miR-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B studies.* J Clin Oncol. 2010 Dec 20; 28(36):5257-64.
- 73 Li Z et al, *Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML.* Blood. 2012 Mar 8; 119(10):2314-24.
- 74 Liersch R et al, *Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults- biological significance and clinical use,* Br J Haematol. 2014 Apr; 165(1):17-38.
- 75 Popovic R et al, *Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization.* Blood. 2009 Apr 2; 113(14):3314-22.
- 76 Dixon-McIver A et al, *Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia.* Plos One.2008 14; 3.
- 77 Liu L et al, *Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells.* J Biol Chem. 2010 Jun 18.285(25):19483-90.
- 78 Luk JM et al, *DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival.* J Biol Chem. 2011; 286:30706-13.
- 79 Zhang Y et al, *MicroRNA-323-3p regulates the activity of polycomb repressive complex 2 (PRC2) via targeting the mRNA of embryonic ectoderm development (Eed) gene in mouse embryonic stem cells.* J Biol Chem. 2013; 288:23659-65.
- 80 Valadi H, *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.* Nat Cell Biol. 2007; 9:654-9.
- 81 Wang K et al, *Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells.* Nucleic Acids Res. 2010; 38:7248-59.
- 82 Cammarata G et al, *Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia.* Am J Hematol. 2010; 85:331-9.
- 83 Hock H et al, *Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells.* Nature. 2004; 431:1002-7.
- 84 Zeng H et al, *Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells.* EMBO J. 2004; 23:4116-25.

Thèse de Doctorat

Estelle PEDRONO

Etude des MicroARNs sériques dans les leucémies aiguës myéloïdes : vers une meilleure compréhension épigénétique de la leucomogénèse et une nouvelle approche de l'évaluation pronostique.

Study of serum microRNA in myeloid acute leukaemia: towards a better understanding of epigenetic leukemogenesis and a new approach to the prognostic evaluation.

Résumé

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des proliférations malignes de progéniteurs bloqués lors de la différenciation myéloïde. Le caryotype des blastes leucémiques identifie 3 groupes pronostiques distincts. Parmi les LAM à risque cytogénétique favorable, figurent les leucémies aiguës promyélocytaires (LAP), et celles avec inv(16) ou t(8;21). Les micro-ARNs sont des acteurs clef de l'hématopoïèse et sont aussi impliqués dans la leucomogénèse des LAM. Ils sont très stables dans le sérum et sont utilisés comme biomarqueurs dans les cancers. Le but de cette thèse était d'évaluer si une caractérisation pangénomique des micro-ARNs sériques permettait de distinguer ces 3 types de LAM entre elles ainsi que les LAM avec caryotype normal (NK-AML); d'identifier des micro-ARNs circulants fortement surexprimés dans les NK-AML par rapport à des sujets sains, pour une utilisation ultérieure comme marqueurs de maladie résiduelle; et de mieux préciser le pronostic des NK-AML. Ainsi, nous avons identifié une signature sérique spécifique des LAP liée à une dérégulation des micro-ARNs localisés dans la région *DLK1-DIO3* soumise à l'empreinte, en 14q32. Ces micro-ARNs, dont l'origine était le blaste leucémique, étaient corrélés aux facteurs pronostiques connus des LAP. Par ailleurs, deux micro-ARNs, miR-10a-3p et miR-196b-5p, distinguant les NK-AML des LAM avec inv(16) ou t(8;21) ont été montrés surexprimés dans les NK-LAM avec une mutation de *NPM1* et/ou de *FLT3-ITD*. Enfin l'expression de ces deux micro-ARNs est corrélée à la dérégulation transcriptionnelle et à la méthylation de l'ADN affectant les gènes *HOX* et *TALE*. En conclusion, cette étude des micro-ARNs sériques ouvre un nouveau champ d'exploration à visée pronostique dans les LAM.

Mots clés

leucémie aiguë myéloïde, leucémie aiguë promyélocytaire, micro-ARN, *DLK1-DIO3*, épigénétique, 14q32, miR-10a-3p, miR-196b-5p, *HOX*, *TALE*

Abstract

Acute myeloid leukaemia (AML) is a malignant proliferation of progenitors blocked during myeloid differentiation. The karyotype of the leukemic blasts identified three distinct prognostic groups. Among the favourable risk cytogenetics AML include acute promyelocytic leukaemia (APL), and those with inv (16) or t (8; 21). Micro-RNAs are key players in hematopoiesis and are also involved in leukemogenesis of AML. They are very stable in serum and used as biomarkers in cancers. The aim of this thesis was to evaluate whether a genome-wide characterization of serum micro-RNAs possible to distinguish these three types of AML them as well as AML with normal karyotype (NK-AML); identify micro-RNAs circulating highly overexpressed in NK-AML compared to healthy subjects, for later use as markers of residual disease; and to better define the prognosis of NK-AML. Thus, we have identified a specific serum signing of LAP related to a deregulation of micro-RNAs located in the *DLK1-DIO3* under the imprinting, in 14q32. These micro-RNAs whose origin was the leukemic blasts were correlated with known prognosis factors of APL. In addition, two micro-RNAs, miR-10a-3p and miR-196b-5p, distinguishing the NK-AML with inv (16)-AML or t (8; 21)-AML have been shown overexpressed in NK-AML with mutation *NPM1* and / or *FLT3-ITD*. Finally the expression of these two micro-RNAs correlates with transcriptional deregulation and DNA methylation affecting *TALE* and *HOX* genes. In conclusion, this study of serum microRNAs opens a new field of exploration to assess the prognosis in AML.

Key Words

myeloid acute leukaemia, promyelocytic acute leukaemia, micro-RNA, *DLK1-DIO3*, epigenetic, 14q32, miR-10a-3p, miR-196b-5p, *HOX*, *TALE*

