

**Undifferentiated Acute Leukemias : a  
models of early arrest in  
hematopoietic differentiation to  
support the understanding of  
oncogenic pathway leading to weak  
lineage commitment**

C.Roumier, U837 Inserm, laboratoire d'hématologie CHRU LILLE

**INCA**, 25 janv 2011

# Leucémies aiguës :

- Dérégulation de l'homeostasie du tissu hématopoïétique.
- Expansion d'un clone leucémique présentant un phénotype malin.
- Blocage dans la différenciation hématopoïétique.

➡ Méthode diagnostique : Assigner ces cellules leucémiques à une lignée de différenciation myéloïde ou lymphoïde via

- Morphologie après coloration panoptique,
- Cytochimie
- Immunophénotype
- Cytogénétique,
- Biologie moléculaire, microarrays ....

Dans certains cas assignation à une voie de différenciation ne peut pas être faite

➡ absence d'expression de marqueurs spécifiques d'une lignée ou expression simultanée de marqueurs lymphoïdes (T ou B) et myéloïdes

➡ phénotype de cellules très indifférenciées (cellules souches leucémiques.?)

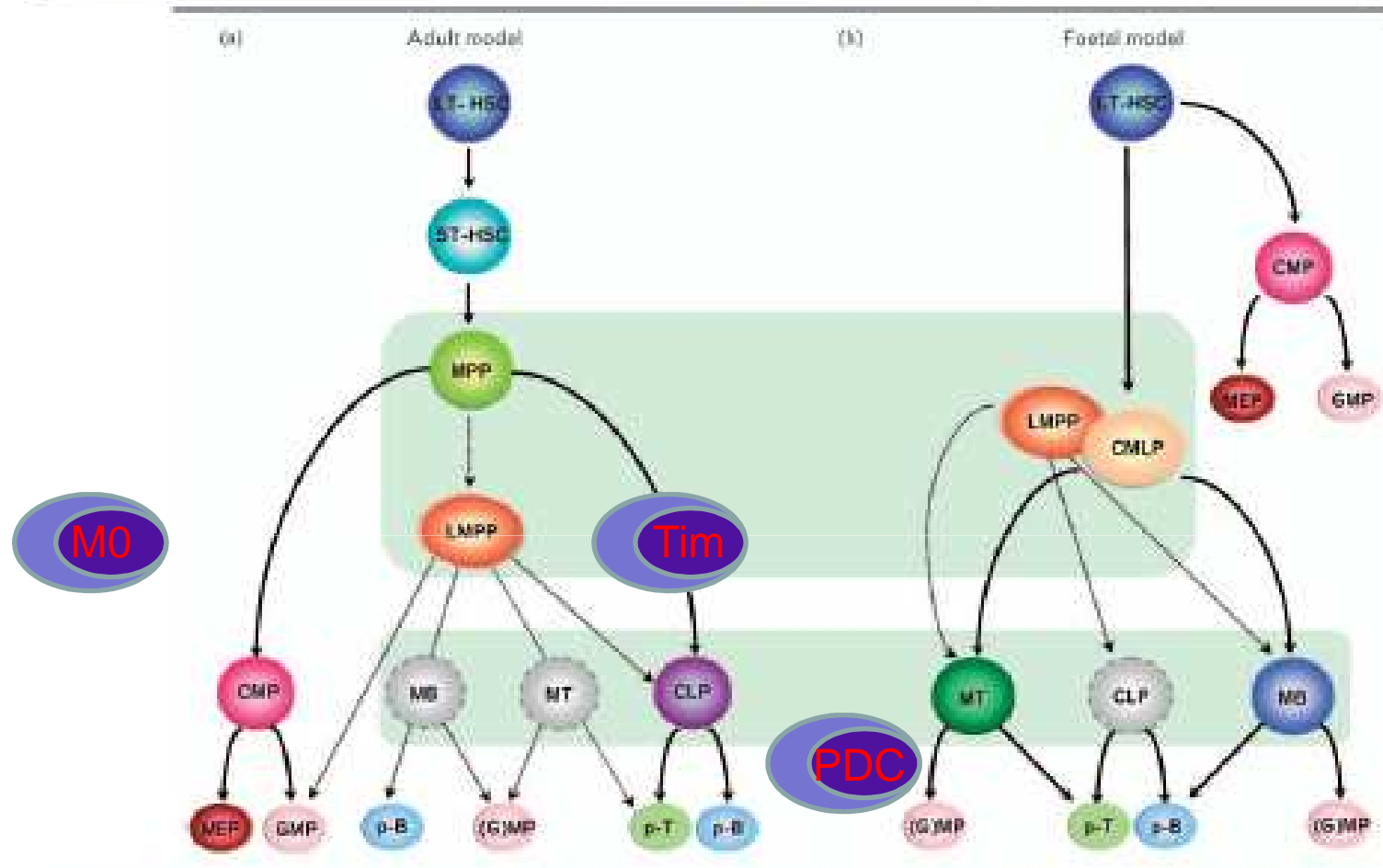
## **Objectifs**

- (i) mieux caractériser ces leucémies peu différenciées en sous groupes selon les premières étapes de l'engagement dans la différenciation
  
- (ii) étudier l'implication dans la leucémogénèse d'altérations critiques de gènes clefs de la différenciation hématopoïétique et la conséquence de ces altérations sur l'engagement dans les stades précoces de la différenciation

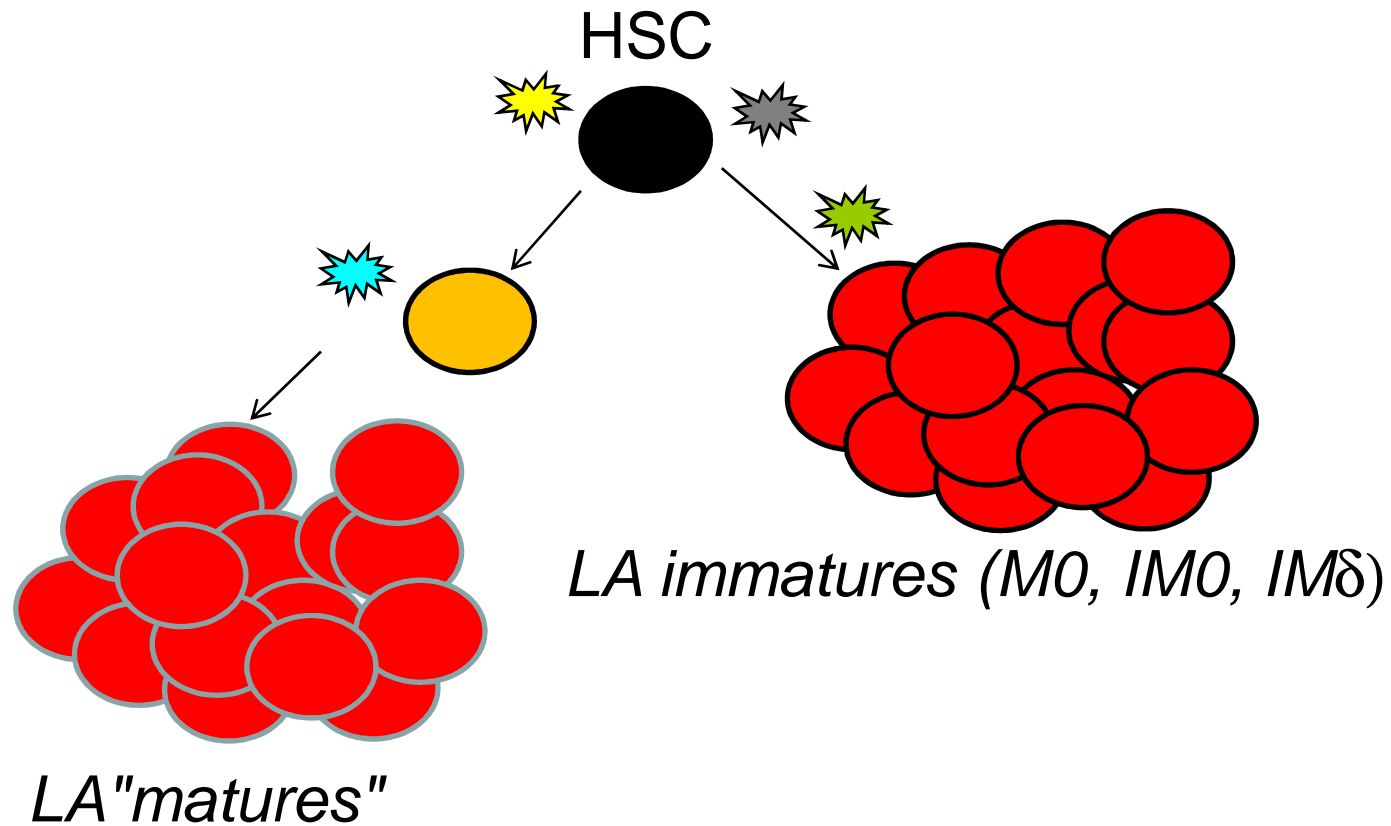
## **Finalité**

Proposer des modalités thérapeutiques sur une classification optimisée des formes de LA peu différenciées

Figure 2 Comparison of proposed models of adult and foetal haematopoietic lineage commitment



Shown is a comparison of proposed pathways of (a) adult [1] and (b) foetal [2] haematopoietic stem cell (HSC) lineage commitment. The pathways for lineage commitment in the original models are indicated by solid arrows. Shaded areas indicate areas of distinct differences between the proposed foetal and adult models for lineage commitment. One distinction is the existence of a common myelo-lymphoid progenitor (CMLP) in the foetal but not in the adult model. As indicated, through the incorporation of adult as well as foetal lymphoid-primed multipotent progenitors (LMPPs; overlapping with CMLP), this distinction is eliminated in the depicted models. This figure indicates how potential although not yet identified pathways (broken arrows) and progenitors (grey), and their connections to the LMPP, might also reconcile some of the proposed differences in the granulocyte/macrophage-lymphoid commitment pathway. CLP, common lymphoid progenitor; CMP, common myeloid progenitor; CMLP, granulocyte/macrophage progenitor; LT, long-term; MB, myeloid and B cells; MEP, megakaryocyte/erythroid progenitor; MT, myeloid and T cells; p-B, B cell progenitor; p-T, T cell progenitor; ST, short-term.



Méthodologie

Etude transcriptome: Puce affymetrix HGU133+2.0

Profilage Génomique ( CNV): Affymetrix SNP 6.0

Screening moléculaire mutationnel

# Projet de recherche translationnelle

## Tumorothèques de Lille , Necker et Besançon

### ▪ Critères inclusion:

Disposer de suffisamment de matériel tumoral pour mener l'étude (RNA, DNA, Cell DMSO).

▪ Première étape : revue collégiales des caractéristiques des patients disponibles et études morphologiques après numérisation des étalements médullaires

Blastes peu ou pas de signes de différenciation:

Cytochimie négative:(peroxydase et esterase NASDA)

Immunophénotype cCD3, CD3, TdT, CD2, CD5, CD7, CD1a, CD4, CD8, TCR, CD34, CD117, CD13, CD33, MPO, CD10, CD19, et cCD79a, CD56, BDCA-2, BDCA-4 .

- LAM type FAB M0 (Exclusion des formes biphénotypique ou bilinéales M+T),
- Leucémies aiguës type PDC.
- LAL T faiblement engagées dans la différenciation lymphoïdes T

**Formes de mauvais pronostic**

# Résultat 1

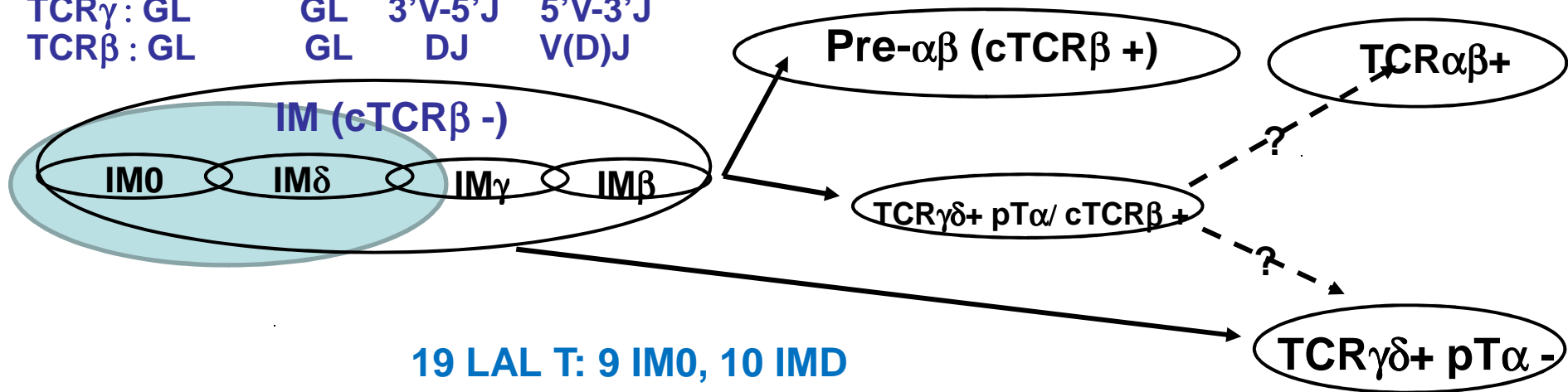
## 54 Echantillons inclus

- 13 PDC (leucémies à cellules dendritiques)
- 22 LAM M0
- 19 LALT

□ 19 LALT on été classées selon le réarrangement du TCR

TCR $\delta$ : GL	DD	DJ/VD	V(D)J
TCR $\gamma$ : GL	GL	3'V-5'J	5'V-3'J
TCR $\beta$ : GL	GL	DJ	V(D)J

*T-ALLs : Oncogenic pathways, Asnafi et al., Blood, 2003-5*



□ Etude des mutations du gènes RUNX1

- :41% (9/22) LAM0
- 1 SNP /13 PDC
- 0%: Tim

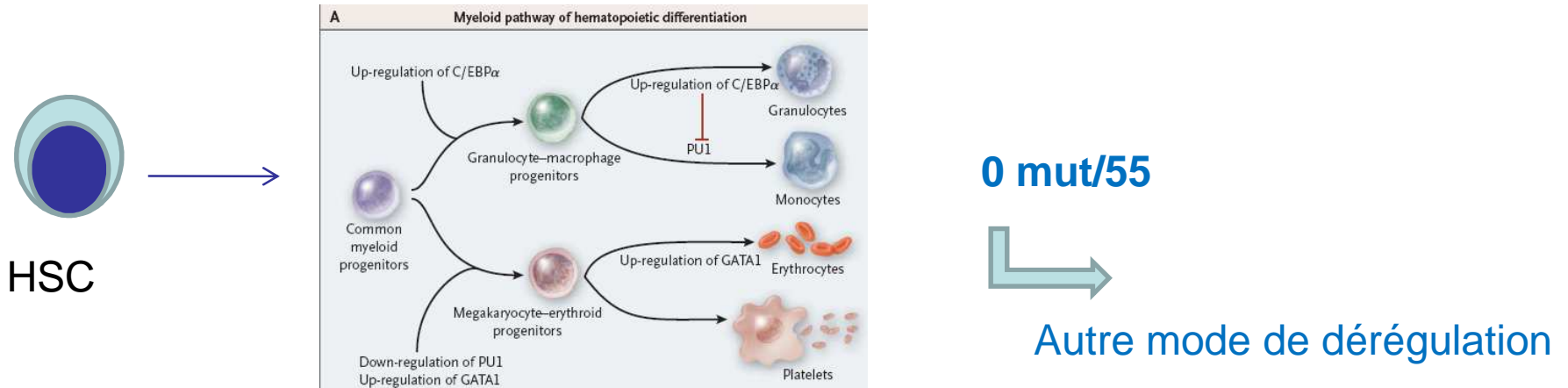


**Mutation RUNX1 spécif des LAM M0**

Etude des mutations d'autres gènes majeurs de l'Hématopoïèse ASXL1, Notch1

# Résultat 2

## Etude des mutations du gènes CEBPa

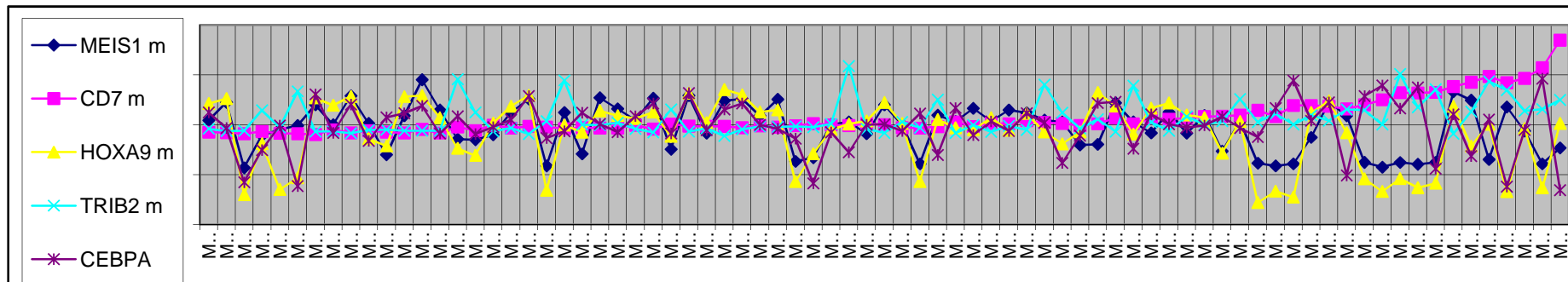


### Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPα and causes acute myelogenous leukemia

CANCER CELL 10, 401-411, NOVEMBER 2006

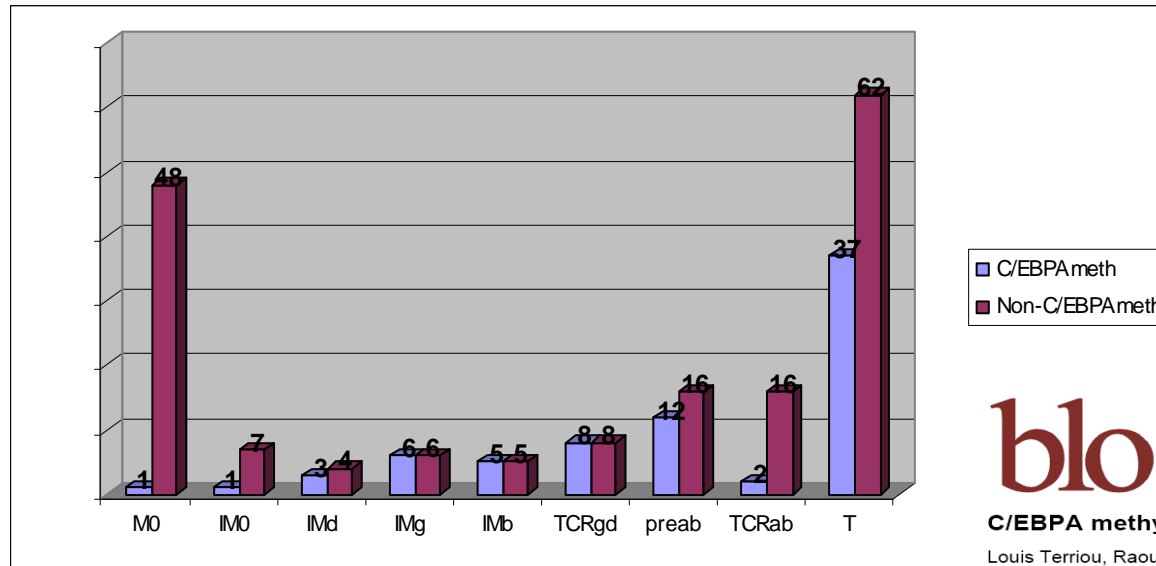
Karen Keeshan,<sup>1</sup> Yiping He,<sup>1</sup> Bas J. Wouters,<sup>2</sup> Olga Shestova,<sup>1</sup> Lanwei Xu,<sup>1</sup> Hong Sai,<sup>1</sup> Carlos G. Rodriguez,<sup>1</sup> Ivan Maillard,<sup>1,3</sup> John W. Tobias,<sup>4</sup> Peter Valk,<sup>2</sup> Martin Carroll,<sup>3</sup> Jon C. Aster,<sup>5</sup> Ruud Delwel,<sup>2</sup> and Warren S. Pear<sup>1,\*</sup>

Trib2 réduit le niveau de transcrit de CEBPa et inhibe ses fonctions



# Résultat 3

## Etude de la méthylation de CEBPa



blood

2009 113: 1864-1866  
doi:10.1182/blood-2008-09-176909

### C/EBPA methylation is common in T-ALL but not in M0 AML

Louis Terriou, Raouf Ben Abdelali, Christophe Roumier, Ludovic Lhermitte, John de Vos, Pascale Cornillet, Olivier Nibourel, Kheira Beldjord, Hervé Dombret, Guy Leverger, Vahid Asnafi, Claude Preudhomme and Elizabeth Macintyre

Table 2. C/EBPA<sup>meth</sup> status of 99 T-ALLs as a function of their Immunophenotype

	CD117	CD2	CD13	CD33	CD34	CD56	CD123	CD1a	CD4	CD8	CD10
C/EBPA <sup>meth</sup>	17*	53*	12	22	29	9	18	49	58	35	38
Non-C/EBPA <sup>meth</sup>	3*	84*	18	13	42	14	20	40	51	52	30

Numbers represent the percentage of positive cases for each antibody tested.

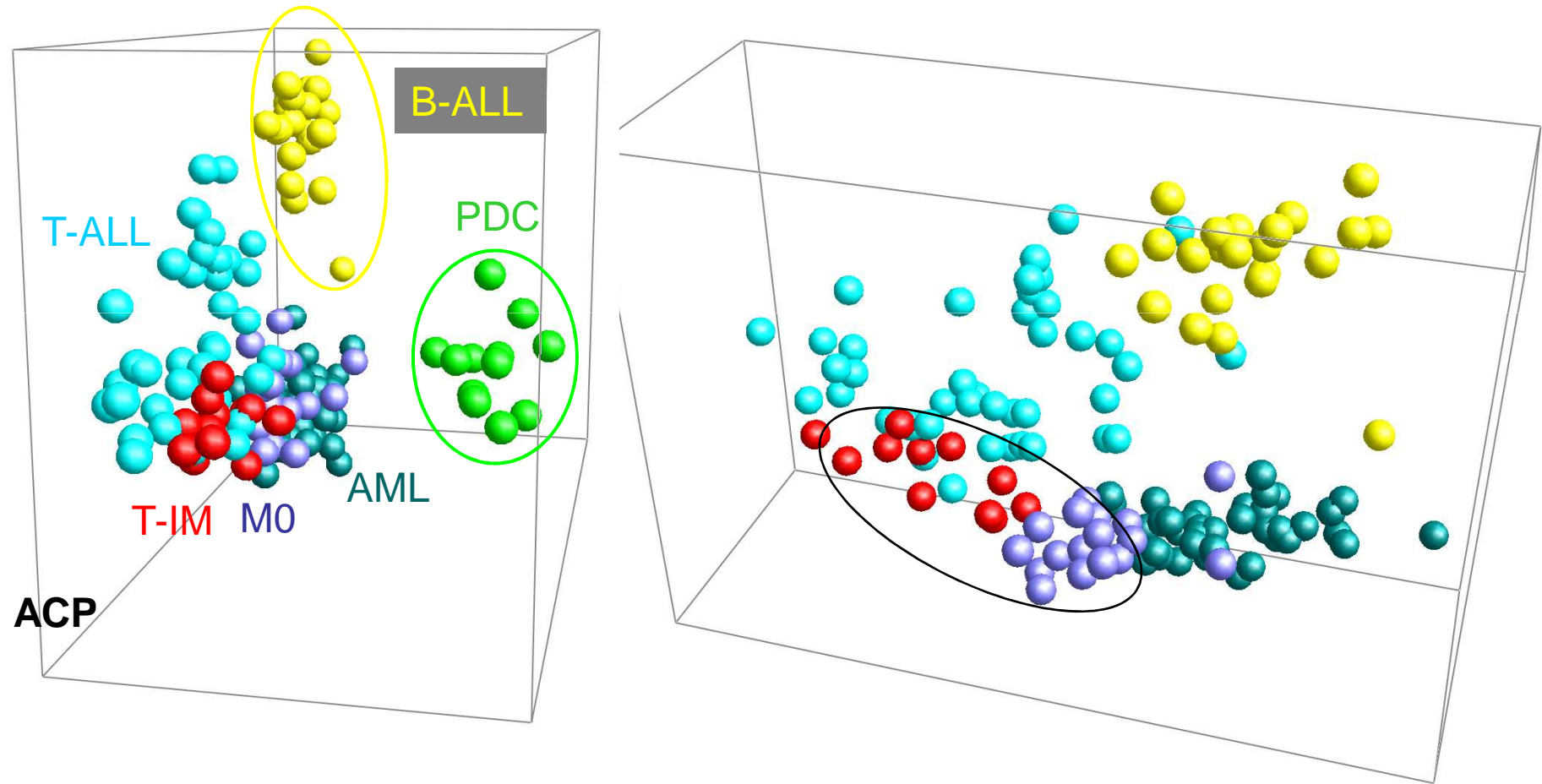
\*P < .05.

## L'inhibition des fonctions de CEBPa

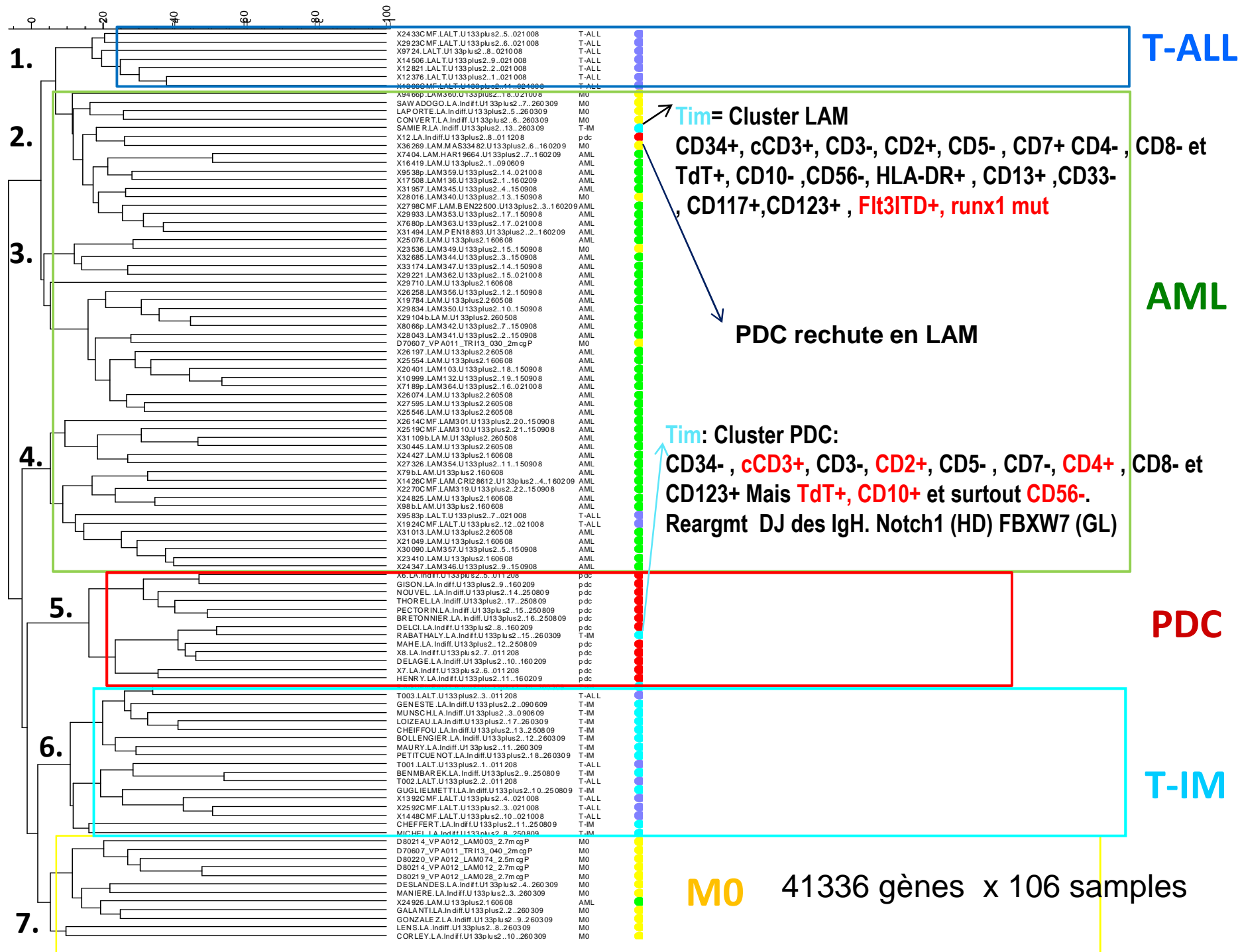
- plutôt par méthylation dans les LALL stade post IM0
- par mutation dans les LAM post M0

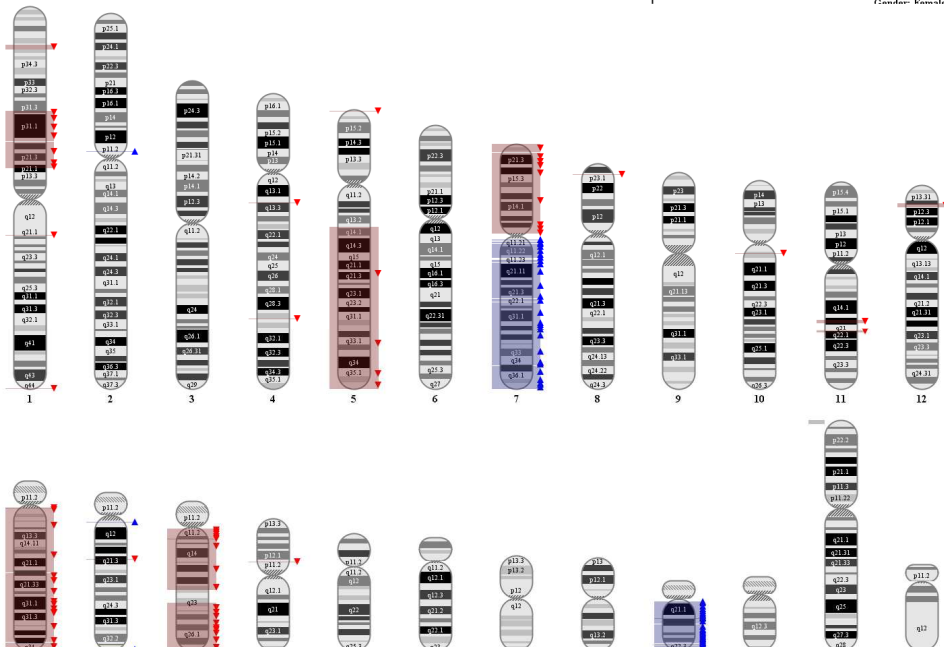
## Résultat 4 Transcriptome

- A) Clustering non supervisé sur l'ensemble des sondes
- B) Comparaison Leucémies indifférenciées vs LAM vs LAL T > TII Egil vs PDC

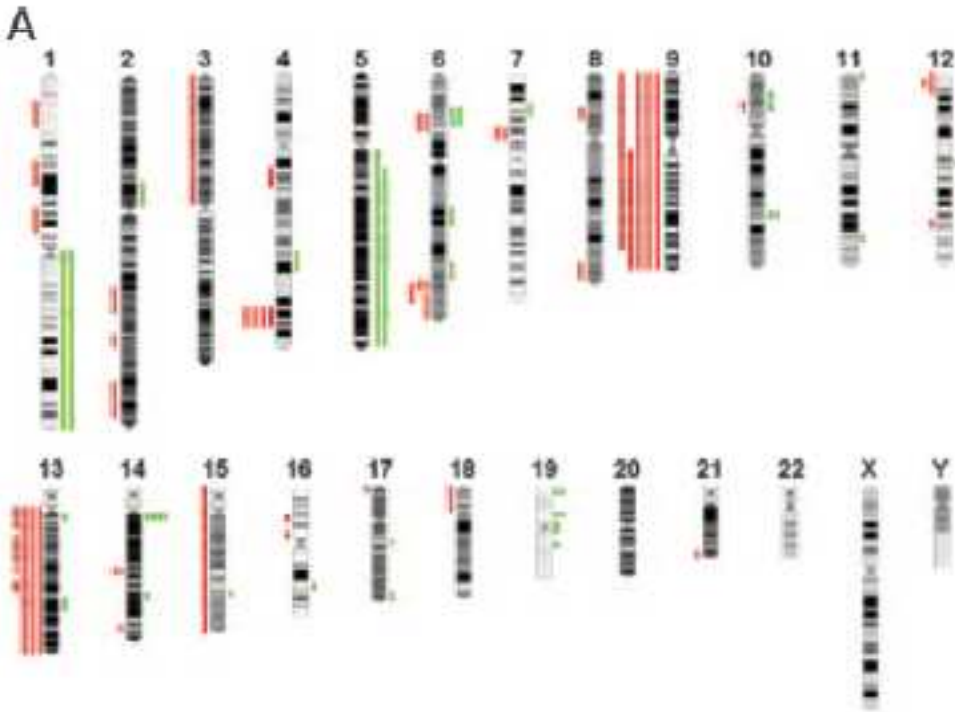


**Intrication des formes M0 et Tim et présence de forme frontières Tim/M0  
Probablement hit leucémique sur cellules peu engagées**





Del1p, del5q, del7p, del13, del15, +21



Gene-expression profiling and array-based CGH classify CD4+CD56+ hematodermic neoplasm and cutaneous myelomonocytic leukemia as distinct disease entities

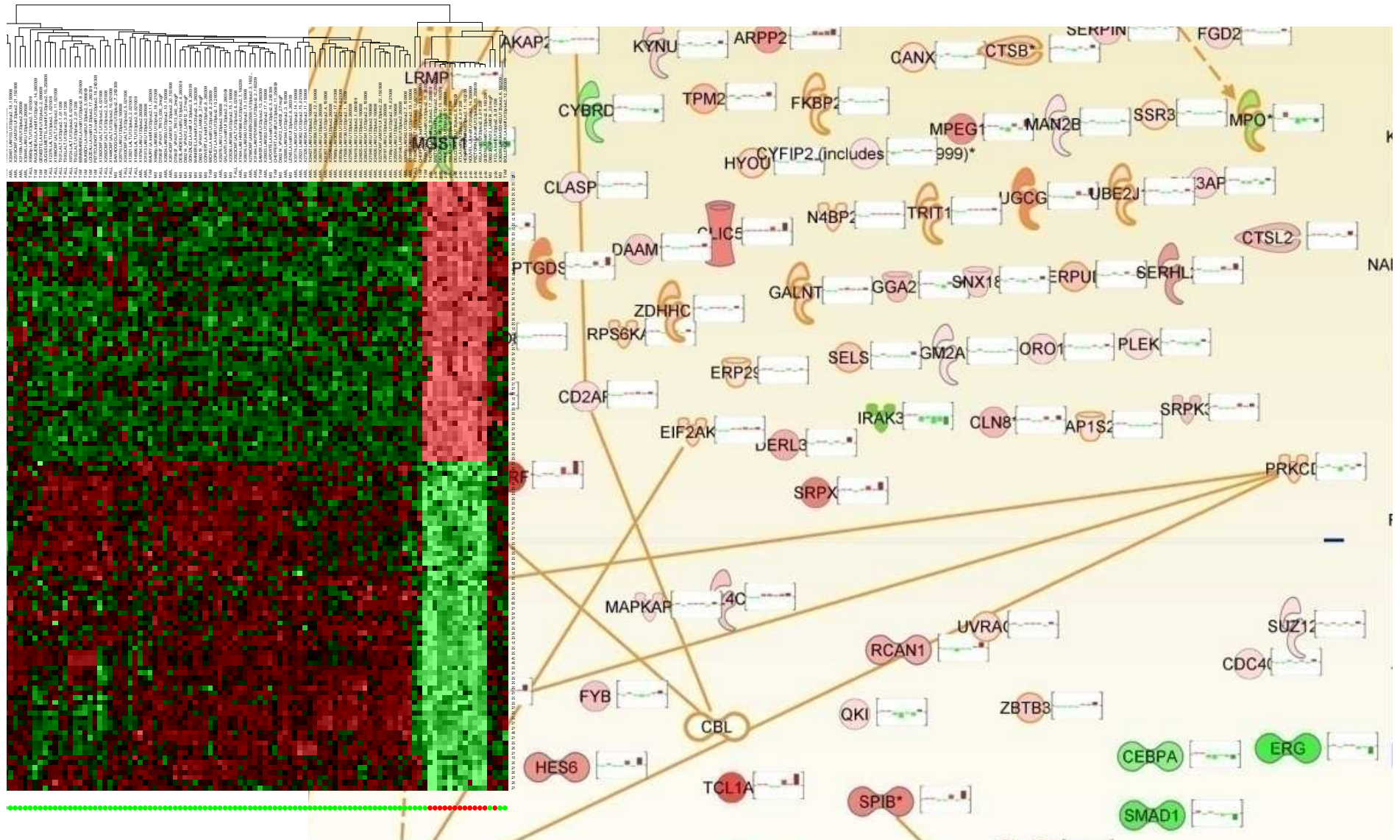
Remco Dijkman, Remco van Doorn, Károly Szuhai, Rein Willemze, Maarten H. Vermeer and Cornelis P. Tensen

Blood, 2007

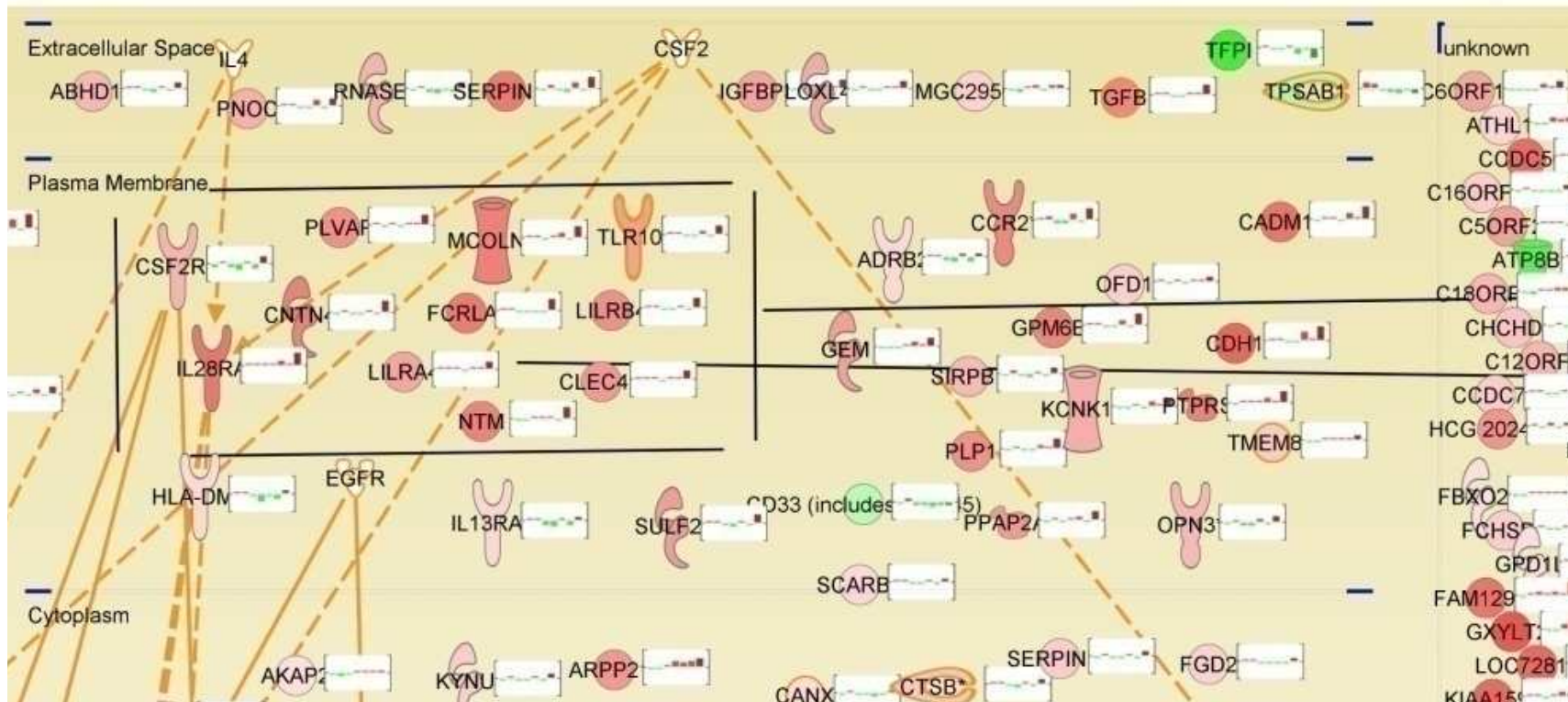
# Résultat 5

## Signature PDC (GEP et CNV)

Liste de 246 gènes



## Résultat 5 Signature PDC (GEP)



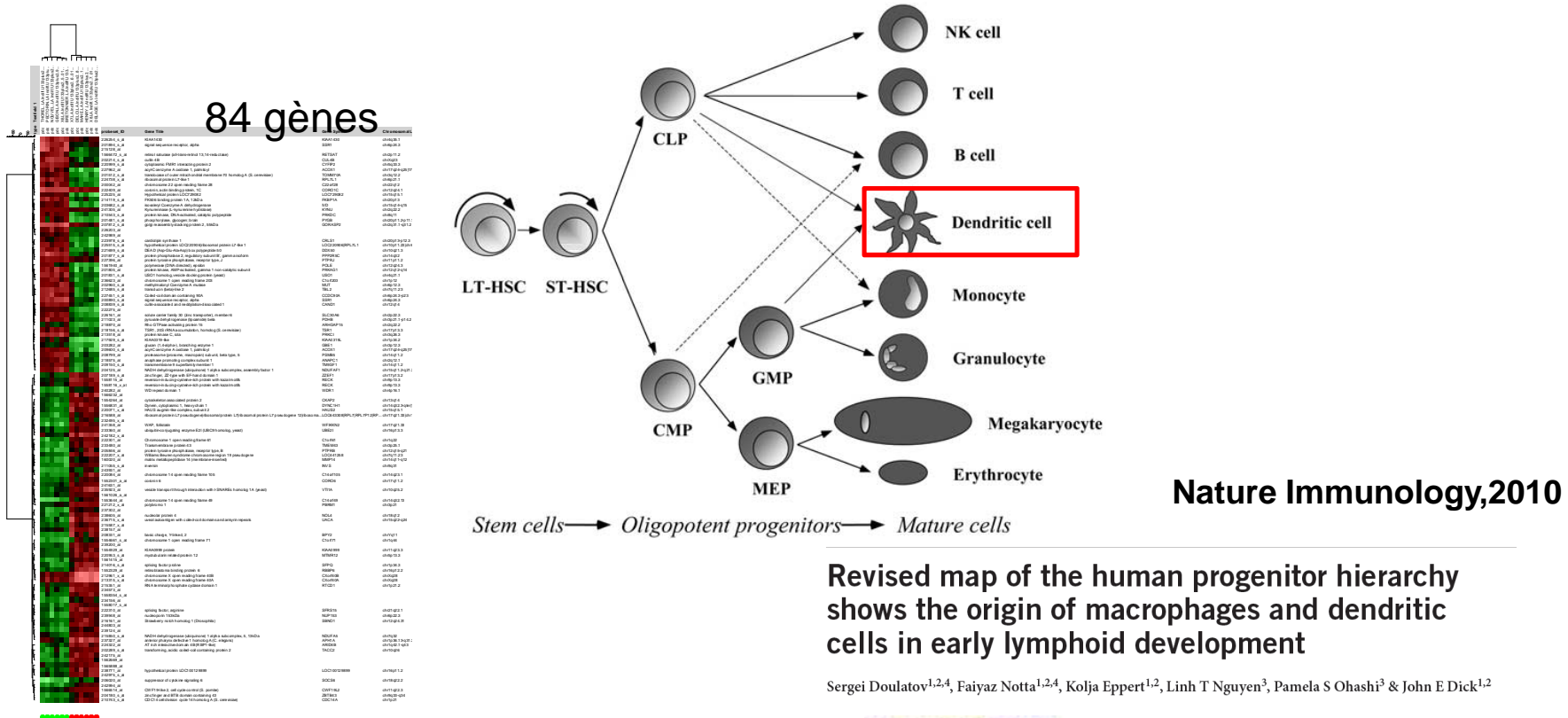
**M0,LAM,IM0,IMD,ND,T,PDC**

Protéine de MB en test

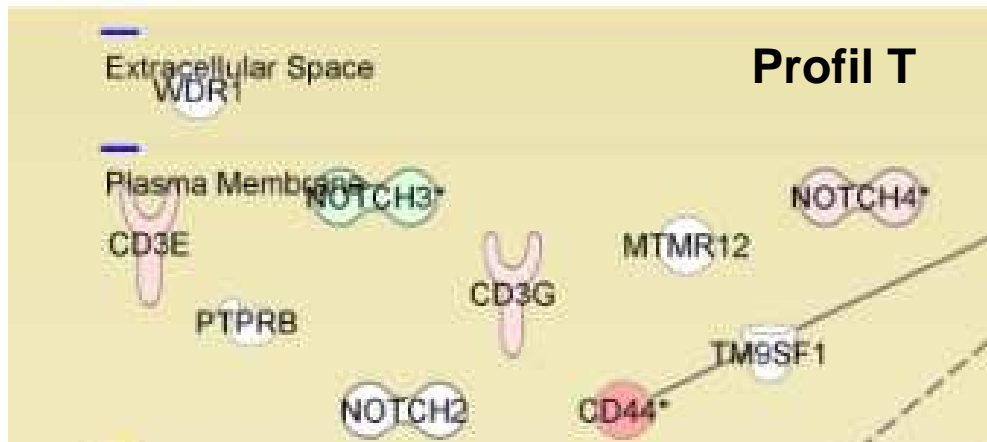
Panel en CMF multiparamétrique

Optimisation immunophenotype PDC vs LAM

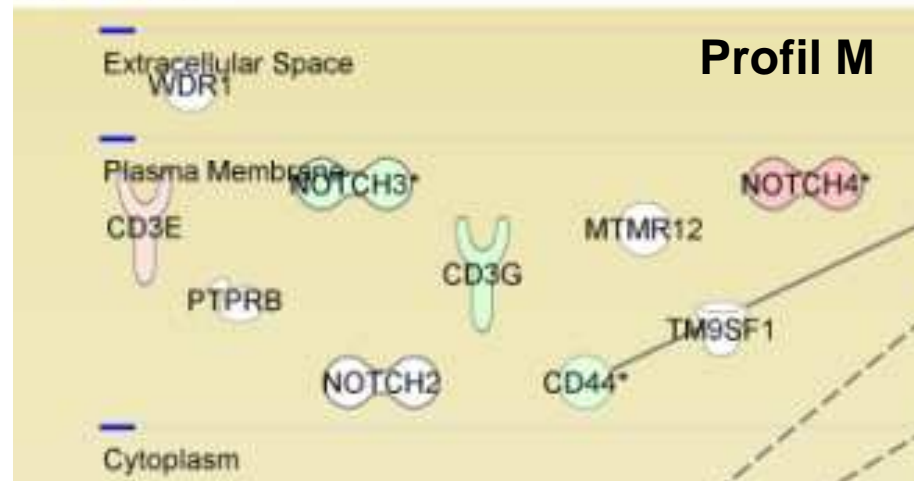
# Résultat 5 Clustering non supervisé des formes PDC: 2 groupes différents



2groupes pDCT



2groupes pDCT



## Résultat 5

### Profil génomique SNPs : signature PDC

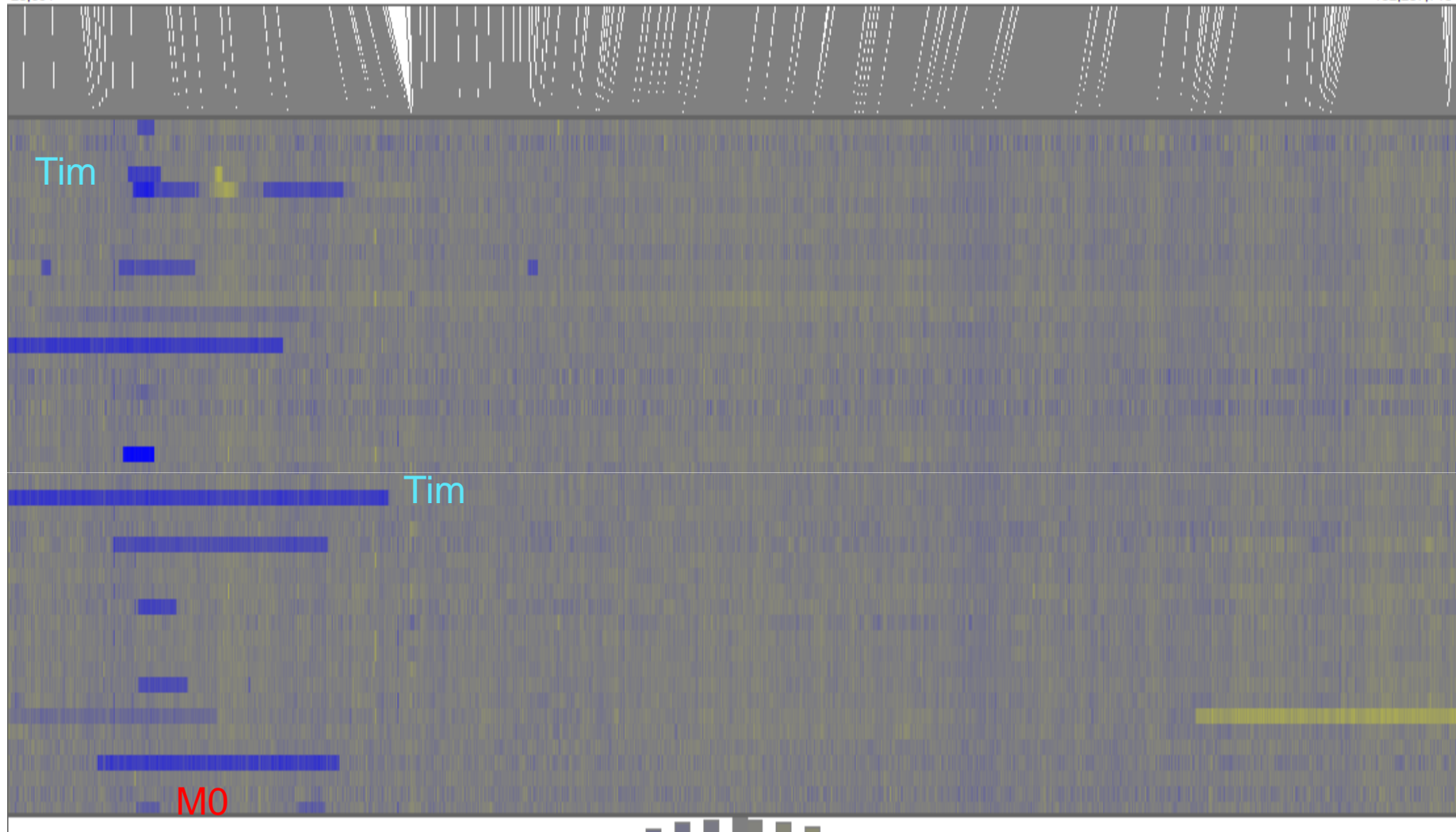
Présence d'anomalies récurrentes

- Del 12p13.2 : ETV6,LRP6, BCL2L14 8/13PDC, 4/19Tim, 1/22M0
- Del 5q : FGF1 4/13PDC, 1/19 Tim, 0/M0
- Del13q ou monosomie 13: 8/13 PDC, 2/19 Tim
- Del 9 6/13 PDC 3/19 Tim

# Résultat 5

20,691

132,287,718

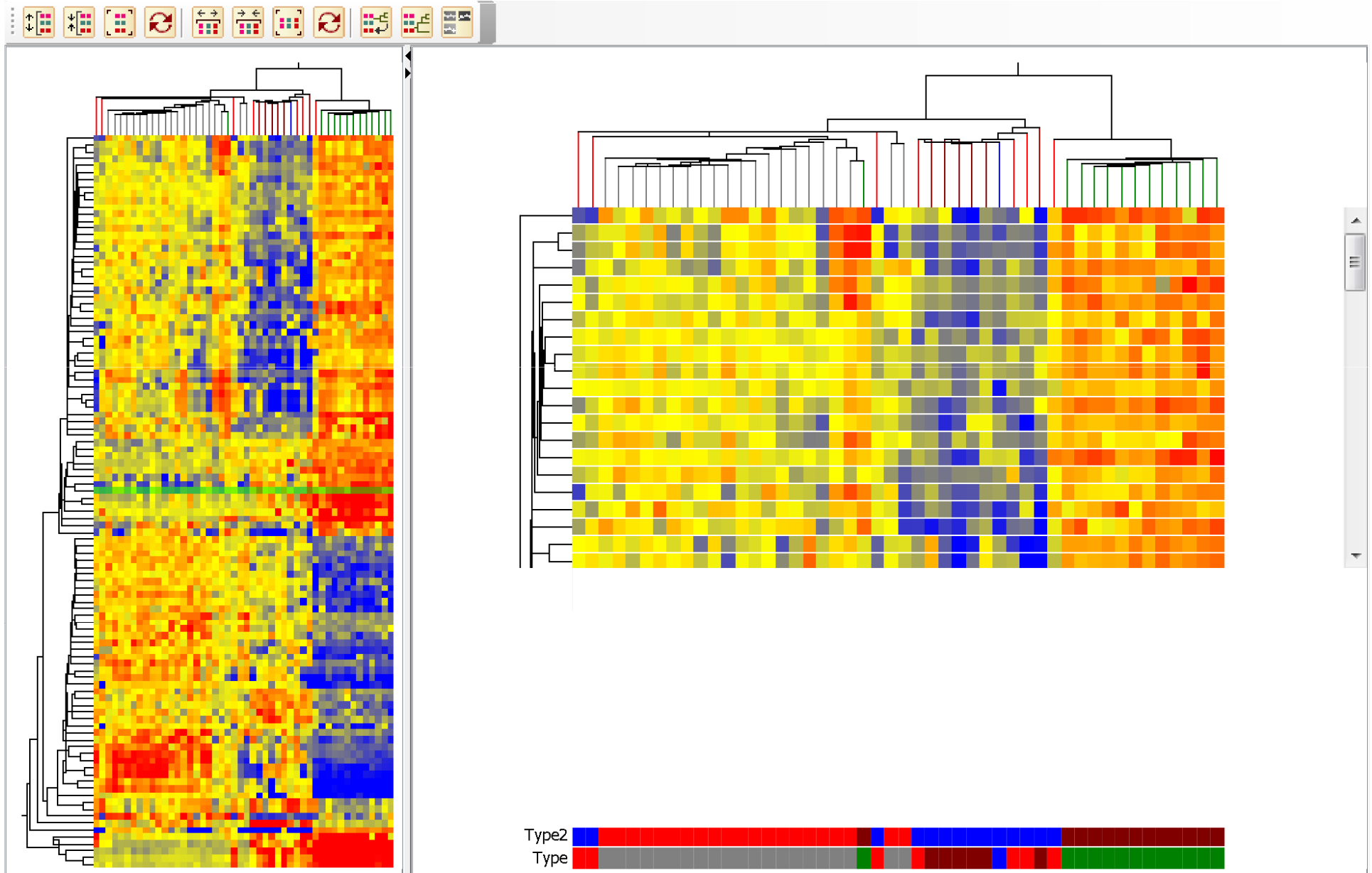


ETV6

Chromosome 12

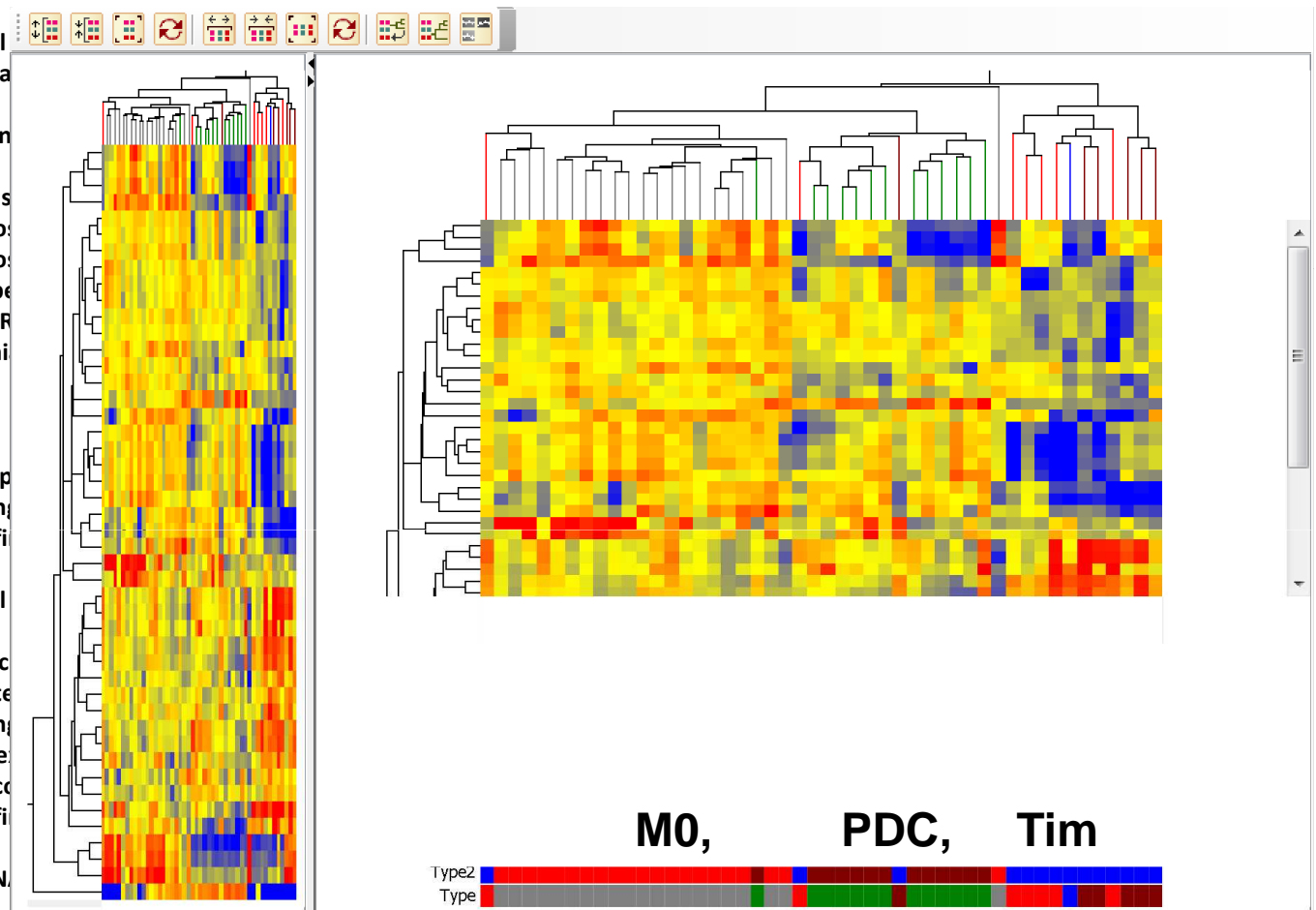
# Résultat 6 signature transcriptionnelle diagnostic

Liste 106 gènes discriminant sTim vs M0vs PDC



# Clustering gènes impliqués dans l'hématopoïèse

EGR1	early growth response 1
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral
TGFB1	transforming growth factor, beta
CD4	CD4 molecule
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein
MEIS1	Meis homeobox 1
PLCG2	phospholipase C, gamma 2 (phos
LCK	lymphocyte-specific protein tyro
LCK	lymphocyte-specific protein tyro
RHOH	ras homolog gene family, membe
CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemi
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3
SYK	spleen tyrosine kinase
BLNK	B-cell linker
CD74	CD74 molecule, major histocomp
CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding
BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc fi
KLF1	Kruppel-like factor 1 (erythroid)
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)
CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR c
ZAP70	zeta-chain (TCR) associated prote
CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding
HLA-DMA	major histocompatibility comple
TACC3	transforming, acidic coiled-coil c
BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc fi
SYK	spleen tyrosine kinase
EGR1	Putative zinc finger protein mRN
BCL6	Zinc finger protein
SFXN1	sideroflexin 1
SP3	Transcription factor SP3 (SP3 gene)
MEIS1	Leukemogenic homolog protein (MEIS1)
CDK6	cyclin-dependent kinase 6
MLL	Homo sapiens, clone IMAGE:6062880, mRNA
ZAP70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa
BCL11A	CDNA FLJ58516 complete cds, highly similar to B-cell lymphoma/leukemia 11A
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain



## Conclusion

Mutations de RUNX1 sont spécifiques des LAM MO (40%)

Méthylation CEBPa dans les LAL (mécanisme physiologique conservé dans les LAL)

Profil d'expression génique : signature spécifique de chaque groupe : M0, Tim et PDC

Signature transcriptomique et profil SNP (CNV) caractéristique des PDC

Mutation autres gènes spécifique lignée : Notch1, ASXL1, PHF6 (résultats partiels)

# Perspectives

- Mise en évidence des liaisons entre mutation génique et dérégulation spécifique de l'hématopoïèse ( ex signature mutation de Runx 1 dans les M0)
- Validation des nouvelles cibles de diagnostic des PDC en CMF multiparamétrique
- Optimisation de la classification des LA peu différenciée par biologie intégrative
- Validation de cette nouvelle classification sur une cohorte indépendante
- prospective associée +/- protocole thérapeutique
- Corrélation des données de biologie intégrative aux données cliniques
- Etude des mécanismes d'engagement vers cellules dendritiques (type de progénie)

## Necker

E.Macyntire  
V.Asnafi  
R Benabdelali  
A Rogy

## Lille

C.Preudhomme  
O.Nibourel

## Besançon

F.Garnache

## Plate forme de Génomique de Lille

M.Figeac  
S.Geffroy  
M.Cheok