



HAL
open science

Apport du séquençage haut débit de gènes ciblés dans la leucémie à tricholeucocytes : mise en évidence d'un nouveau gène altéré, KDM6A, dans la forme variante de la maladie

Elsa Maitre

► To cite this version:

Elsa Maitre. Apport du séquençage haut débit de gènes ciblés dans la leucémie à tricholeucocytes : mise en évidence d'un nouveau gène altéré, KDM6A, dans la forme variante de la maladie. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01953584

HAL Id: dumas-01953584

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01953584>

Submitted on 13 Dec 2018

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

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



LISTE DES ENSEIGNANTS – CHERCHEURS

Année Universitaire 2017 / 2018

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs
Professeur Frédéric FABIS
Professeur Pascale SCHUMANN-BARD

Directrice administrative et Directrice administrative adjointe
Madame Sarah CHEMTOB
Madame Alexandra HOUARD

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GAUDUCHON Pascal Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Biologie cellulaire
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
RAULT Sylvain Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Chimie thérapeutique
ROCHAS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale



MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR

Biochimie, Toxicologie

BOUET Valentine – HDR

Physiologie, Pharmacologie

CAILLY Thomas – HDR

Chimie bio-inorganique, Chimie organique

DENOYELLE Christophe – HDR

Biologie cellulaire et moléculaire,

Biochimie, Cancérologie

DHALLUIN Anne

Bactériologie, Virologie, Immunologie

ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR

Parasitologie, Mycologie médicale

GROO Anne-Claire

Pharmacie galénique

KIEFFER Charline

Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier)

Biologie clinique

LAPORTE-WOJCIK Catherine

Chimie bio-inorganique

LEBAILLY Pierre – HDR

Santé publique

LECHEVREL Mathilde – HDR

Toxicologie

LEGER Marianne

Physiologie, Pharmacologie

LEPAILLEUR Alban – HDR

Modélisation moléculaire

N'DIAYE Monique

Parasitologie, Mycologie médicale,

Biochimie clinique

PAIZANIS Eleni

Physiologie, Pharmacologie

PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima

Chimie organique et thérapeutique

POTTIER Ivannah

Chimie et toxicologie analytiques

PREVOST Virginie – HDR

Chimie analytique, Nutrition, Education

thérapeutique du patient

QUINTIN Jérôme

Pharmacognosie

RIOULT Jean-Philippe

Botanique, Mycologie, Biotechnologies

SINCE Marc

Chimie analytique

VILLEDIEU Marie

Biologie et thérapies innovantes des

cancers

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie

Anglais



PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume

Pharmacie clinique

SEGONZAC Alain

Pharmacologie, Essais cliniques

RICHARD Estelle

Pharmacie officinale

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Remerciements

A Madame le **Professeur Pascale SCHUMANN-BARD**, de me faire l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le **Professeur Xavier TROUSSARD**, de m'avoir proposé ce sujet de travail sur cette entité particulièrement intéressante qu'est la leucémie a tricholeucocytes. Merci pour le soutien que vous m'avez apporté durant ces années de spécialisation, de votre confiance et de me pousser au meilleur.

A Monsieur le **Professeur Fabrice JARDIN**, de m'avoir accueillie pour cette collaboration normande ; merci de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire, et de m'avoir soutenue et aidée dans la réalisation de ce projet.

A Monsieur le **Professeur Gandhi DAMAJ**, de votre présence dans ce jury et votre soutien dans les différents projets collaboratifs clinico-biologiques.

A Madame le **Docteur Véronique SALAUN**, de votre présence dans ce jury, votre disponibilité, vos conseils, votre rigueur dans l'enseignement de ces passionnantes disciplines que sont la cytologie et la cytométrie en flux. Merci aussi pour vos corrections sur ce manuscrit.

A Dina, merci de m'avoir gentiment accompagnée dans ce projet. Merci pour ton soutien et l'enseignement que tu m'as transmis en biologie moléculaire.

A Edouard, merci pour ton aide et ton soutien dans la réalisation de ce projet et aussi pour la transmission de tes connaissances.

A Brigitte, merci de ton encadrement et de m'avoir accueillie dans cette merveilleuse équipe Micah, merci de ta présence de ton soutien et ta bonne humeur ! Merci aussi au reste de l'équipe Anne, Hadjer, Simon et Elodie pour cette super année passée à vos côtés, j'ai hâte de remettre ça !

Ce travail n'aurait pas été mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux de Philippe Bertrand, Catherine Maingonnat et Pierre-Julien Vially. Merci pour votre aide dans cette aventure du séquençage à haut débit. Merci pour votre gentillesse et

pour m'avoir transmis toutes ces connaissances qui me serviront tout au long de mon cursus professionnel.

Merci au reste de l'équipe médicale du laboratoire d'hématologie (Florence, Carole, les hémostasiens : Yohann, Philippe, Marie, Annie Borel-Derlon, Agnès Lequerec) pour votre accueil et disponibilité pendant ma spécialisation au laboratoire d'hématologie.

Merci à tous les techniciens du laboratoire d'hématologie (et du niveau 3 en général) pour votre bonne humeur votre patience dans nos débuts un peu maladroits et votre gentillesse dans la transmission de vos connaissances.

A François pour ta présence dans les bons comme les mauvais moments, pour ton soutien indéfectible et ton amour. Merci de toujours voir le meilleur en moi.

A mes parents sans qui rien n'aurait été possible ! Merci pour votre présence, votre confiance et votre soutien de toujours. Que ce travail soit l'expression de tout mon amour pour vous.

A mes sœurs Estelle et Laetitia, merci par votre exemple, de m'avoir poussée à faire aussi bien que vous, en moins littéraire certes (nul n'est parfaits !).

A la *team relecture* : papa, maman, Estelle, Laetitia Aurélie, Véronique et Eliane, merci mille fois pour la mise en place ce relais de haute volée. Vous avez été d'une réactivité et d'une présence à toute épreuve malgré vos disponibilités réduites. Je n'ai qu'un regret c'est que votre aptitude grammaticale n'ait jamais déteint sur moi...

A mes grand-parents chéris, merci d'être toujours là pour moi.

A Eliane, merci pour votre gentillesse et votre présence. Merci de m'avoir accueillie lors de tous ces week-end cherbourgeois, merci aussi pour les précieux ravitaillements en lasagnes yaourts et fromage !

A mes amis présents et passés, aux internes (et anciens internes) qui m'ont accompagnée au cours de ces années, merci pour tous les bons moments partagés ensemble.

Merci aux patients qui grâce à leur consentement pour l'utilisation du matériel biologiques, autorisent la mise en place des projets de recherche qui permettent d'améliorer les connaissances sur ces pathologies rares.

Table des Matières

Remerciements	1
Table des Matières	3
Liste des abréviations	1
Liste des figures et tableaux	5
Liste des annexes	7
Introduction	9
I. Contexte de l'étude	11
II. Etat de l'art : une maladie d'intérêt	12
1. Epidémiologie : une maladie rare	12
2. Physiopathologie : des mécanismes pathobiologiques complexes .	14
2-1. Origine de la cellule tumorale	14
2-2. Dérégulation de la voie MAPK	15
2-3. Rôle du microenvironnement, cytokines	17
2-4. Voie PI3k/Akt/mTOR	19
2-5. Voie NF κ -B.....	20
2-6. Voie du BCR.....	20
2-7. Tricholeucocyte : une cellule à haute instabilité génétique	22
III. Diagnostic : données clinico-biologiques	24
1. Présentation clinique	24
2. Examens biologiques utiles	24
2-1. Cytologie	24
2-2. Anatomopathologie	26
2-3. Immunophénotypage par cytométrie en flux	27
2-4. Biologie moléculaire	28
2-4-1. Voie des MAPK : BRAF et MAP2K1	28
2-4-2. Statut des IGHV	30
2-4-3. Cycle cellulaire : TP53 et CDKN1B	30
2-5. Données pronostiques/prédictives	31
3. Les entités frontières : un diagnostic différentiel difficile	31

3-1.	Lymphome splénique de la zone marginale.....	32
3-2.	Forme variante de la leucémie à tricholeucocytes /lymphome diffus de la pulpe rouge	33
4.	Prise en charge thérapeutique	34
5.	Apport du séquençage à haut débit dans les hémopathies : définition du Trichopanel	36
5-1.	« Lymphopanel » : origine et intérêt.....	36
5-2.	Choix des gènes du « Trichopanel ».....	37
5-3.	Choix de la zone à séquencer.....	44
Matériel et Méthode.....		45
1.	Cohorte de patients et recueil des données clinico-biologiques :	47
2.	Séquençage à haut débit (NGS) :	47
3.	Séquençage selon la méthode de Sanger :.....	51
4.	Analyses statistiques :.....	53
Résultats		55
I.	Analyse épidémiologique de la cohorte de patients :	57
II.	Analyse moléculaire de la cohorte :.....	59
1.	Données globales de l'analyse NGS des patients au diagnostic.....	59
2.	Résultats de NGS dans les lignées cellulaires	64
3.	Résultats de la cohorte des patients HCL-c.....	64
3-1.	<i>BRAF</i>	64
3-2.	Mutations additionnelles à <i>BRAF</i> ^{V600E}	65
3-2-1.	KLF2	65
3-2-2.	CDKN1B	66
4.	Résultats de la cohorte des patients HCL-v	67
4-1.	MAP2K1	67
4-2.	Régulation épigénétique.....	67
5.	Variations du nombre de copies	69
6.	Analyse des prélèvements issus de la rechute	70
7.	Répercussion clinique.....	71
Discussion.....		73
I.	Le Trichopanel : un outil d'intérêt	75
1.	Lignées cellulaires : des modèles atypiques	75
2.	Les patients atteints d'HCL-c ont des mutations récurrentes.....	76

2-1. La mutation $BRAF^{V600E}$: mutation driver	76
2-2. Mutations associées à $BRAF^{V600E}$	76
3. Analyse des patients $BRAF^{V600E}$ négatifs : un profil atypique	78
3-1. Mutations dans $MAP2K1$	79
3-2. Les mutations dans les gènes de la régulation épigénétique sont récurrentes dans l'HCL-v	80
4. Evolution clonale de la maladie.....	82
5. La perte de copie de $MAPK15$ est l'anomalie de copie la plus fréquente dans l'HCL-c.....	84
6. Comparaisons des résultats avec les études publiées.....	85
Conclusions et perspectives	87
Annexes	91
Bibliographie	100

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

BCR (*B-cell receptor*) : récepteur des lymphocytes B

bFGF : *basic fibroblast growth factor*

BOM : biopsie oséto-médullaire

BRAF : *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*

BRAF^{V600E} : mutation NM_004333:c.1799T>A,p.V600E du gène *BRAF*

BRAF^{WT} : gène *BRAF* non muté (*Wild Type*)

BSA (*bovine serum albumin*) : sérumalbumine bovine

BTK : Bruton Tyrosine Kinase

CD : cluster de différenciation

CMF : cytométrie en flux

CNV (*Copy Number Variation*) : Variation du nombre de copies

CXCL12 : *C-X-C Motif Chemokine ligand 12* (également appelé SDF-1)

CXCR : *C-X-C Motif Chemokine receptor*

DLBCL (*Diffuse large B-cell lymphoma*) : lymphome B diffus à grandes cellules

ERK : *extracellular signal-Regulated Kinase*

FGFR1 : *fibroblast growth factor receptor 1*

H3K27 : lysine 27 de la protéine Histone 3

HCL-c : leucémie à tricholeucocytes, forme classique

HCL-v : leucémie à tricholeucocytes, forme variante

HSC (*Hematopoietic stem cell*) : cellule souche hématopoïétique

IGHV (*Immunoglobulin Heavy chain Variable*) : gènes codant pour la partie variable des chaînes lourdes des immunoglobulines

JNK : *c-Jun N-terminal kinase*

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MEK1 : *mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase 1*

MGG: May-Grünwald-Giemsa

mTOR : *mammalian target of rapamycin*

NLS (*Nuclear Localization Signal*) : signal de localisation nucléaire

NES (*nuclear export signal*) : signal d'export nucléaire

NFS: numération formule sanguine

NF κ -B : *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*

OS (*overall survival*) : survie globale

PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) : cellules mononucléées circulantes

PFS (*Progression free survival*) : survie sans progression

PI3k : *phosphatidylinositol 3 kinase*

PMBL (*Primary mediastinal large B-cell lymphoma*) : lymphome B à grandes cellules primitif du médiastin

RAS : *rat sarcoma viral oncogene*

RB : rétinoblastome

SDF-1 : *stromal cell derived factor 1*

SDRPL (*splenic diffuse red pulp lymphoma*) : lymphome splénique diffus de la pulpe rouge

SINE (*selective inhibitor of nuclear export*) : inhibiteur sélectif de l'export nucléaire

SMZL (*splenic maginal zone lymphoma*) : lymphome splénique de la zone marginale

SNV (*single nucleotide variant*) : variant nucléotidique

STR (*Serin Threonin Rich region*) : région riche en sérines et thréonines

SYC : *Spleen tyrosin kinase*

TCBN : Tumorothèque de Caen Basse-Normandie

TFS (*Treatment free survival*) : durée sans traitements

TGF- β 1 : *Transforming growth factor 1*

TGF β R : *Transforming growth factor receptor*

TNF α : *Tumor necrosis α*

TNR (*TNF α receptor*) : Récepteur au TNF α

UPN : *Unique patient number*

VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule 1*

WES (*Whole exome sequencing*) : séquençage complet de l'exome

ZnF : Domaine en doigts de Zinc

Liste des figures et tableaux

Figure 1 Frise historique de l'évolution des connaissances dans la leucémie à tricholeucocytes [6].	12
Figure 2 Hypothèse de la leucémogénèse dans l'HCL	15
Figure 3 Voie MAPK	16
Figure 4 Voies cellulaires	18
Figure 5 Processus de recombinaison et hypermutation du BCR	21
Figure 6 Représentation schématique de la compilation des 4 études de WES dans l'HCL-c et HCL-v.	23
Figure 7 Lymphocytes chevelus	25
Figure 8 Immunophénotypage d'un cas de leucémie à tricholeucocytes	27
Figure 9 Représentation schématique de la localisation des mutations dans le gène <i>BRAF</i>	29
Figure 10 Cycle cellulaire	30
Figure 11 Cibles thérapeutiques dans l'HCL-c	36
Figure 12 Voie MAPK ciblée par le Trichopanel	40
Figure 13 Voie NOTCH et gènes de la régulation épigénétique ciblée par le Trichopanel	41
Figure 14 Voies NF- κ B et autres gènes ciblés par le Trichopanel	42
Figure 15 Etapes analytiques du séquençage à haute débit par la technologie Ion Torrent® (ThermoFisher Scientific).	50
Figure 16 Analyse cytologique et immunophénotypique des patients atypiques	59
Figure 17 Exemples de chromatogrammes de 3 SNV validés par la méthode Sanger	60

Figure 18 Représentation en <i>Heat-Map</i> des mutations d'intérêts dans la cohorte de patients et les 3 lignées cellulaires	61
Figure 19 Représentation de la prédication du saut d'exon sur le logiciel Alamut®	63
Figure 20 Représentation des mutations de la cohorte de patients dans <i>BRAF</i>	64
Figure 21 Représentation des mutations de la cohorte de patients dans <i>KLF2</i>	65
Figure 22 Représentation des mutations de la cohorte de patients dans <i>CDKN1B</i>	66
Figure 23 Représentation des mutations de la cohorte de patients dans <i>MAP2K1</i>	67
Figure 24 Représentation des mutations de la cohorte de patients dans <i>KDM6A</i> ..	68
Figure 25 Chromatogramme du séquençage de l'ARN de <i>KDM6A</i> chez UPN-v1 ..	68
Figure 26 Représentation des CNV chez les patients étudiés	69
Figure 27 Profils d'évolution clonale de la maladie lors de la rechute.....	71
Figure 28 La délétion de <i>MAPK15</i> améliore la PFS chez les patients étudiés.....	72

Tableau 1 Comparaison des données clinico-biologiques du diagnostic différentiel entre HCL-c, HCL-v, SDRPL et SMZL. Modifié d'après [51,54,57,63,84,91,93,93–98]	32
Tableau 2 Résumé des différentes mutations retrouvées dans les études de WES [30,58–60]	38
Tableau 3 Liste des gènes séquencés dans le Trichopanel.....	39
Tableau 4 Liste et séquence des amorces utilisées pour le séquençage Sanger...	52
Tableau 5 Milieux réactionnels du séquençage par la technique de Sanger	53
Tableau 6 Protocole d'amplification par PCR.....	53
Tableau 7 Analyse épidémiologique de la cohorte de patients étudiée en NGS.....	58

Liste des annexes

Annexe 1 Tableau S1 : Caractéristiques de la cohorte de patients étudiée par NGS	93
Annexe 2 Tableau S2 : Trichopanel : données de couverture et profondeur par patient	94
Annexe 3 Tableau S3 : Résultats de NGS par patient	95
Annexe 4 Tableau S4 : Données de NGS pour les lignées cellulaires.....	96
Annexe 5 Figure S1 : Représentation IGV des <i>reads</i> amplifiés d'UPN-38 dans <i>KLF2</i>	97
Annexe 6 Figure S2 : Représentation des CNV de UPN-v3	98
Annexe 7 Figure S3 : Poster présenté à l'ASH 2017	99

Introduction

I. Contexte de l'étude

La leucémie à tricholeucocytes (HCL pour *Hairy Cell Leukemia* en anglais) est une hémopathie lymphoïde rare. Elle est définie comme une prolifération anormale de lymphocytes B matures clonaux. Le terme tricholeucocyte provient du grec ancien thrix, trikhos (θρίξ, θριχός) signifiant poil, cheveux ; leukos (λευκός) blanc et kytos (κύτος) cellule. Le tricholeucocyte a comme particularité de présenter de fines projections cytoplasmiques sur le pourtour de la cellule, ce qui lui donne un aspect « chevelu ».

Les caractéristiques cliniques et biologiques sont bien définies, d'un point de vue cytologique, moléculaire et immunophénotypique. Cependant le diagnostic peut être délicat notamment la distinction avec d'autres proliférations à lymphocytes chevelus que sont la leucémie à tricholeucocytes dans sa forme variante (HCL-v), le lymphome splénique diffus de la pulpe rouge (SDRPL) et le lymphome splénique de la zone marginale (SMZL). De fait, nous distinguerons dans ce travail la forme dite classique de la maladie (HCL-c) de la forme variante (HCL-v). Des outils biologiques se sont développés pour faciliter aux biologistes et cliniciens la distinction entre ces différentes entités.

Ainsi en 2011, la découverte par l'équipe de Tiacci *et al.* de la mutation récurrente $BRAF^{V600E}$ dans l'HCL-c et non retrouvée dans les entités frontières a permis une première stratification dans la classification.

Cependant, selon les séries étudiées, l'absence de la mutation $BRAF^{V600E}$ dans l'HCL-c peut être retrouvée dans 20% des cas. Dans ces cas, le diagnostic différentiel est d'autant plus difficile. Un score immunophénotypique reposant sur la détection de quatre marqueurs (CD103, CD123, CD25 et CD11c) permet d'orienter le diagnostic. De récentes études moléculaires ont recherché des marqueurs utiles au diagnostic différentiel. Cependant, à la fois pour le score immunophénotypique et les mutations décrites, il existe un chevauchement entre l'HCL-v et le SDRPL rendant le diagnostic différentiel difficile.

Grâce à sa démocratisation, le séquençage à haut débit dans les hémopathies lymphoïdes, a démontré un réel intérêt dans la classification des pathologies mais aussi dans la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

C'est dans ce contexte que nous avons souhaité mettre en place un panel ciblé de gènes à séquencer, par une méthode à haut débit. Cette étude a été réalisée sur une cohorte de patients suivis au CHU de Caen présentant une leucémie à tricholeucocytes dans sa forme classique ou variante.

II. Etat de l'art : une maladie d'intérêt

1. Epidémiologie : une maladie rare

Les premières séries de leucémies à tricholeucocytes ont été décrites en 1956 et 1958 par Gosselin *et al.* et Bouroncle *et al.* [1,2] (Figure 1). Cette pathologie est alors nommée reticuloendothéliose leucémique (*leukemic reticuloendotheliosis*) en référence aux cellules du système réticulo-endothélial que sont les monocytes et macrophages. Ce terme utilisé pour la première fois par le Dr Ewald en 1923 [3] regroupe de nombreuses entités allant de la leucémie aigue monocyttaire, l'histiocytose, à la leucémie à tricholeucocytes. Cette dénomination est alors contestée dans les années 70, préférant le terme *Hairy cell leukemia* [4,5]. En effet en cette période, les premières données cytochimiques rapprochent le tricholeucocyte du lymphocyte plutôt que des cellules histiocytaires/monocytaires [4].

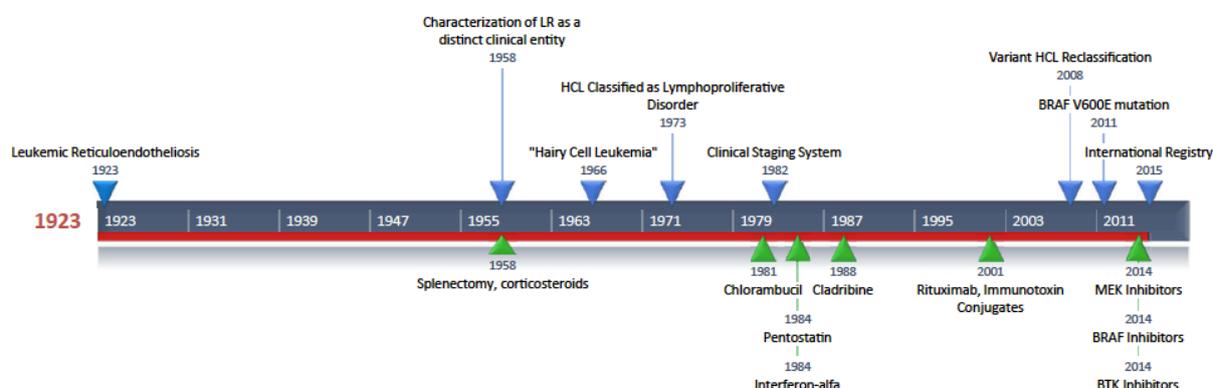


Figure 1 | Frise historique de l'évolution des connaissances dans la leucémie à tricholeucocytes [6].

Ces difficultés de classification sont à corrélées à la rareté de la pathologie. En effet dans une récente étude épidémiologique menée aux Etats-Unis, l'incidence de l'HCL-c et de l'HCL-v étaient de 0,3 et 0,2 pour 100 000 habitants respectivement [7]. A titre de comparaison la leucémie lymphoïde chronique (LLC) avait sur la même période une incidence de 5,1 pour 100 000 habitants [7]. En France, l'incidence de l'HCL-c est estimée à 0,29 pour 100 000 habitants [8].

L'HCL-c touche préférentiellement des hommes d'âge moyen. La médiane au diagnostic est de 54-55 ans avec un sexe ratio (Homme/femme) de 3,9/1 [9,10]. Ce sur-risque masculin peut être lié à plusieurs facteurs ; tout d'abord des facteurs environnementaux, en relation avec une exposition accrue aux pesticides, aux dérivés du pétrole et agent ionisants [11]. Une étude franco-australienne portant sur 154 patients a ainsi révélé une association positive entre le métier d'agriculteur et l'HCL-c [12]. Dans un second temps, des événements génétiques sur le chromosome X, que nous explorerons davantage dans la partie discussion, sont susceptibles de favoriser le déséquilibre homme/femme [13]. De manière surprenante le tabac semble être un événement protecteur dans la survenue d'HCL-c sans pour autant que cette association soit clairement élucidée [12].

Chez les patients atteints d'HCL-c, l'apparition de cancers secondaires n'est pas rare : 3,7 à 22% des cas [9,14,15]. Ce sont principalement des tumeurs solides : tumeurs de la prostate, broncho-pulmonaires ou cutanées [9,15,16]. Les cancers hématologiques secondaires sont d'origine myéloïde ou lymphoïde [12,14,17]. L'apparition de ces cancers secondaires est plurifactorielle et révélée par un suivi prolongé de ces patients après traitement (évolution indolente de la pathologie). Les chimiothérapies elles-mêmes ont été incriminées *via* leurs effets délétères sur l'ADN ou de par leurs effets immunosuppresseurs [15,18,19]. Il est à noter que le tricholeucocyte lui-même a des effets immunosuppresseurs pouvant favoriser l'apparition de cancers secondaires [20].

La présence de doubles hémopathies concomitantes est aussi possible (la seconde hémopathie étant découverte maximum 12 mois après le diagnostic de la première, en l'absence de traitement) [9,21]. Dans la cohorte du CHU de Caen sur 77 HCL-c, trois avaient une seconde hémopathie concomitante (2 patients avec une leucémie lymphoïde chronique (LLC) et un patient avec une gammopathie monoclonale).

2. *Physiopathologie : des mécanismes pathobiologiques complexes*

2-1. Origine de la cellule tumorale

L'origine cellulaire du tricholeucocyte n'est à ce jour pas complètement élucidée. Des études de transcriptomes suggèrent que le tricholeucocyte dérive d'un lymphocyte B mémoire [22]. Cependant l'expression du CD27 par les lymphocytes B est fortement corrélée à l'appartenance au groupe B mémoire. Or les tricholeucocytes n'expriment pas le CD27 [23]. Récemment une nouvelle sous-population de lymphocytes B mémoires ayant perdu le CD27 a été mise en évidence [24,25] et semble être un bon candidat pour expliquer l'origine du tricholeucocyte.

En 2014 une découverte par Chung *et al.* a bouleversé l'approche développementale de la pathologie. En effet, la mutation caractéristique de l'HCL, : $BRAF^{V600E}$, a été mise en évidence dans des cellules souches hématopoïétiques (HSC) de patients atteints d'HCL-c [26]. De plus, l'analyse en parallèle, par séquençage ciblé, des HSC mutées et des tricholeucocytes a révélé l'apparition de nouvelles mutations, acquises dans la cellule mature tumorale. Ainsi contrairement aux modèles classiques où une cellule post germinale mature accumule des anomalies génétiques favorisant la survie et la prolifération, ici le premier hit oncogénique aurait lieu dans la cellule souche hématopoïétique. C'est l'accumulation d'anomalies génétiques lors de la maturation qui confèrerait le caractère tumoral au tricholeucocyte (Figure 2). L'hypothèse d'un précurseur muté est étayée par plusieurs *case report* de doubles hémopathies où les deux composantes sont porteuses de la mutation $BRAF^{V600E}$. Cela a été décrit chez un patient atteint d'HCL-c et d'un sarcome histiocytaire et chez un patient atteint d'HCL-c et de LLC [26,27].

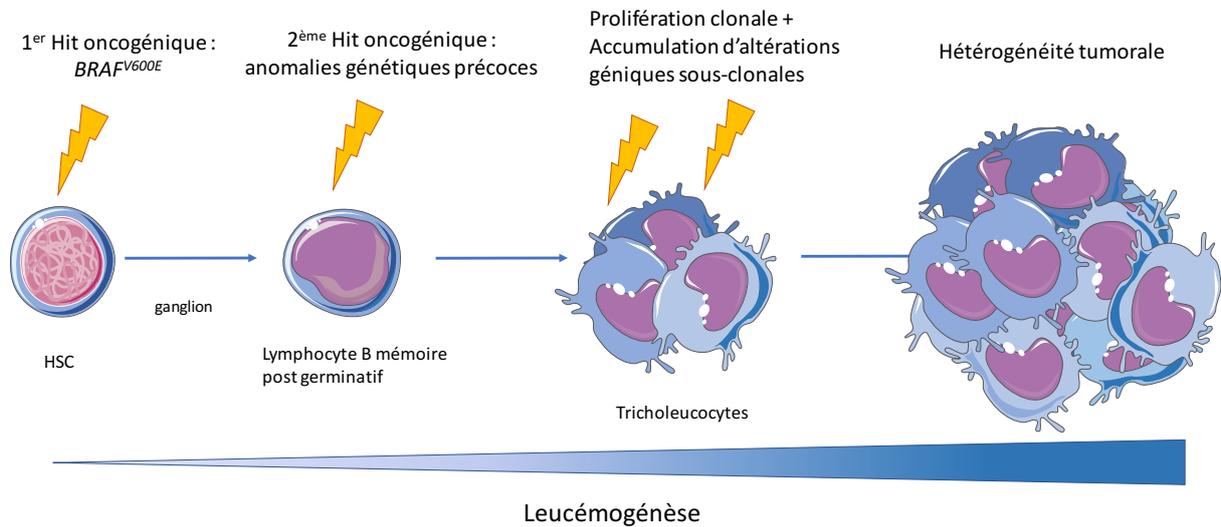


Figure 2 | Hypothèse de la leucémogénèse dans l'HCL

L'acquisition de la mutation $BRAF^{V600E}$ serait un premier hit oncogénique précoce puis l'accumulation de mutations dans des gènes autres que $BRAF$ serait nécessaire au développement de la maladie. Réalisé d'après [24–26].

2-2. Dérégulation de la voie MAPK

Sans que le mécanisme ne soit complètement élucidé, en 2003, deux équipes ont démontré que la voie des *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) était dérégulée dans l'HCL-c. Ces publications mettent en évidence, dans des lignées d'HCL-c et des cellules primaires de patients, à la fois une surexpression des formes phosphorylées/activées des protéines activées par la voie MAPK : JUN et ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) (Figure 3A), ainsi qu'une sensibilité accrue des tricholeucocytes aux inhibiteurs de la voie MAPK [28,29]. L'équipe de Kamiguti *et al.* va plus loin et montre que la protéine B-RAF (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) est constitutivement activée chez deux des trois patients testés [29].

C'est en 2011, par une étude de *whole exome sequencing* (WES), que la mutation $BRAF^{V600E}$ a été mise en évidence dans l'HCL-c [30]. Cette mutation est située dans le domaine kinase, active la voie MAPK [31].

Dans un fonctionnement normal, les signaux de survie extracellulaires (EGF, intégrines...) induisent l'activation de RAS (*Rat sarcoma viral oncogene*). RAS va phosphoryler C-RAF et B-RAF qui forment un hétérodimère induisant la

phosphorylation de MEK1/2 (*Mitogen activated protein/Extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2*). MEK1/2 va à son tour phosphoryler et activer ERK1/2. ERK1/2 transloque dans le noyau pour réguler, par son activité facteur de transcription, des gènes impliqués dans la survie et la prolifération des cellules (dont *AP-1* (*activator protein 1*) et *c-Myc*) (Figure 3A). En cas de mutation $BRAF^{V600E}$, B-RAF est activé constitutivement (l'activité est augmentée de 700 fois) et peut directement phosphoryler MEK1/2 [31] (Figure 3B). L'hétérodimérisation avec C-RAF n'est plus nécessaire à l'activation de la voie [31].

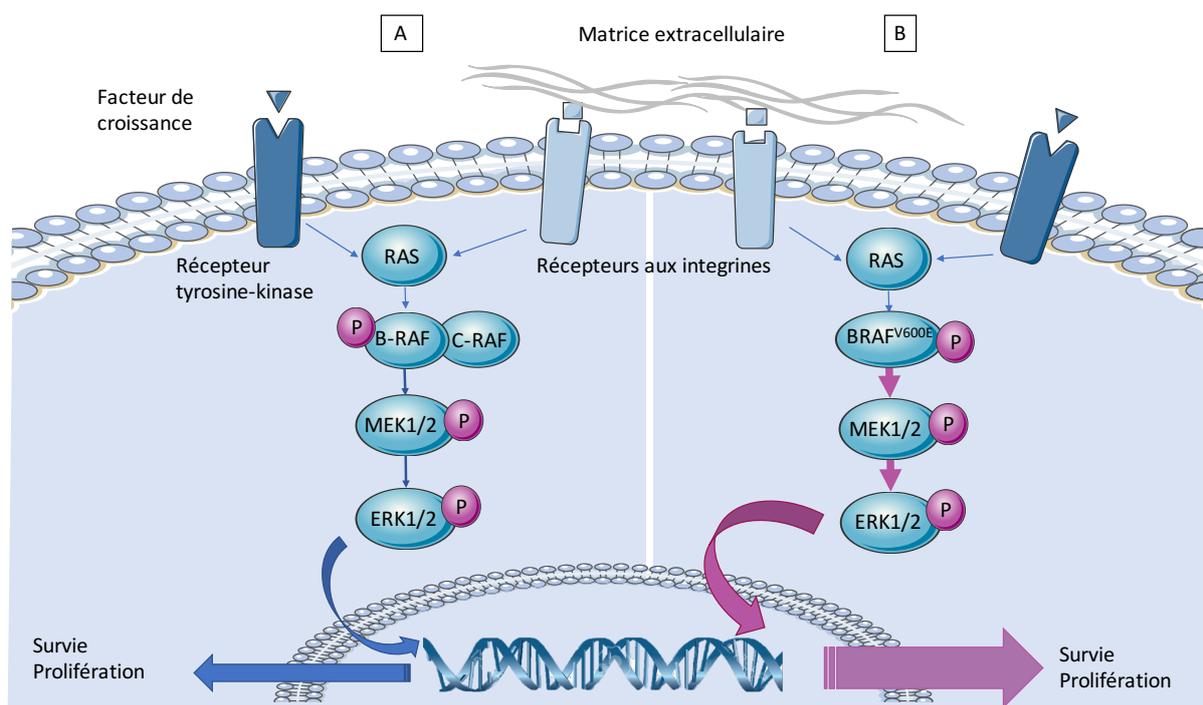


Figure 3 | Voie MAPK

(A) Les signaux de survie extracellulaires (EGF, intégrines) induisent l'activation de RAS. RAS va phosphoryler C-RAF et B-RAF qui forment un hétérodimère induisant la phosphorylation de MEK1/2 puis ERK1/2. ERK1/2 transloque dans le noyau pour réguler la survie et la prolifération cellulaire. (B) Activation constitutive de la voie MAPK à cause de la mutation $BRAF^{V600E}$. Réalisé d'après [31,32]

La voie de signalisation MAPK est une voie cellulaire hautement conservée dans l'évolution et contrôle des processus cellulaires fondamentaux comme la survie et la prolifération [33]. Les MAPK sont des sérines-thréonines kinases qui ont des rôles clés dans la transduction du signal et l'activation. Il existe des MAPK dites conventionnelles (ERK1/2, p38, c-Jun N-terminal kinase : JNK1, JNK2 et JNK3 et ERK5) et des MAPK atypiques (ERK3/4, ERK7/8 et Nemo like kinase) [33].

AP-1 est un facteur de transcription composé de c-Jun et c-Fos, l'*up-regulation* d'AP-1 entraîne entre autres, une surexpression du CD11c et de la cycline D1 [33]. Ces deux marqueurs, impliqués dans l'adhésion/migration et dans le cycle cellulaire respectivement sont surexprimés dans l'HCL-c [34]

Les MAPK ont aussi un rôle direct dans la régulation des protéines de la famille de Rho-GTPases, certaines de ces protéines sont surexprimées dans l'HCL-c (CDC42, RAC1 et RhoA) et seraient à l'origine, de par leur interaction avec le cytosquelette, de l'aspect chevelu des cellules [35].

2-3. Rôle du microenvironnement, cytokines

Le tricholeucocyte a une forte relation avec son microenvironnement, lui apportant des signaux de survie, de migration et de résistance aux traitements. Ces différentes voies coopèrent entre elles et induisent des phénomènes oncogéniques sur la migration, la prolifération et la survie. Ces interactions sont représentées sur la figure 4.

Le tricholeucocyte sous-exprime les récepteurs aux chimiokines de type *C-X-C Motif Chemokine receptor* : CXCR7, CXCR5 et la L-sélectine (CD62L) [36]. Ces récepteurs sont impliqués dans le tropisme ganglionnaire. Cette sous-expression explique ainsi l'absence d'adénopathies dans l'HCL-c. A l'inverse CXCR4 est surexprimé dans la pathologie [36]. Son ligand, CXCL12, également appelé SDF1 (*stromal cell derived factor 1*) est sécrété par les cellules endothéliales sinusoïdales et réticulaires périvasculaires attirant ainsi le tricholeucocyte dans la moelle osseuse et la rate (Figure 4). De plus, l'expression de VLA-4 par le tricholeucocyte permet une interaction avec la fibronectine et contribue à l'adhésion de cette cellule dans la moelle osseuse [37].

L'infiltration de la pulpe rouge de la rate et la formation de pseudosinus sont liées à la forte expression de VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*) et de vitronectine par le tissu splénique. Le tricholeucocyte surexprime le CD49d (VLA-4, $\alpha 4\beta 1$) et le CD51 ($\alpha V\beta 3$), des intégrines spécifiques à VCAM-1 et à la vitronectine respectivement [38,39] (Figure 4).

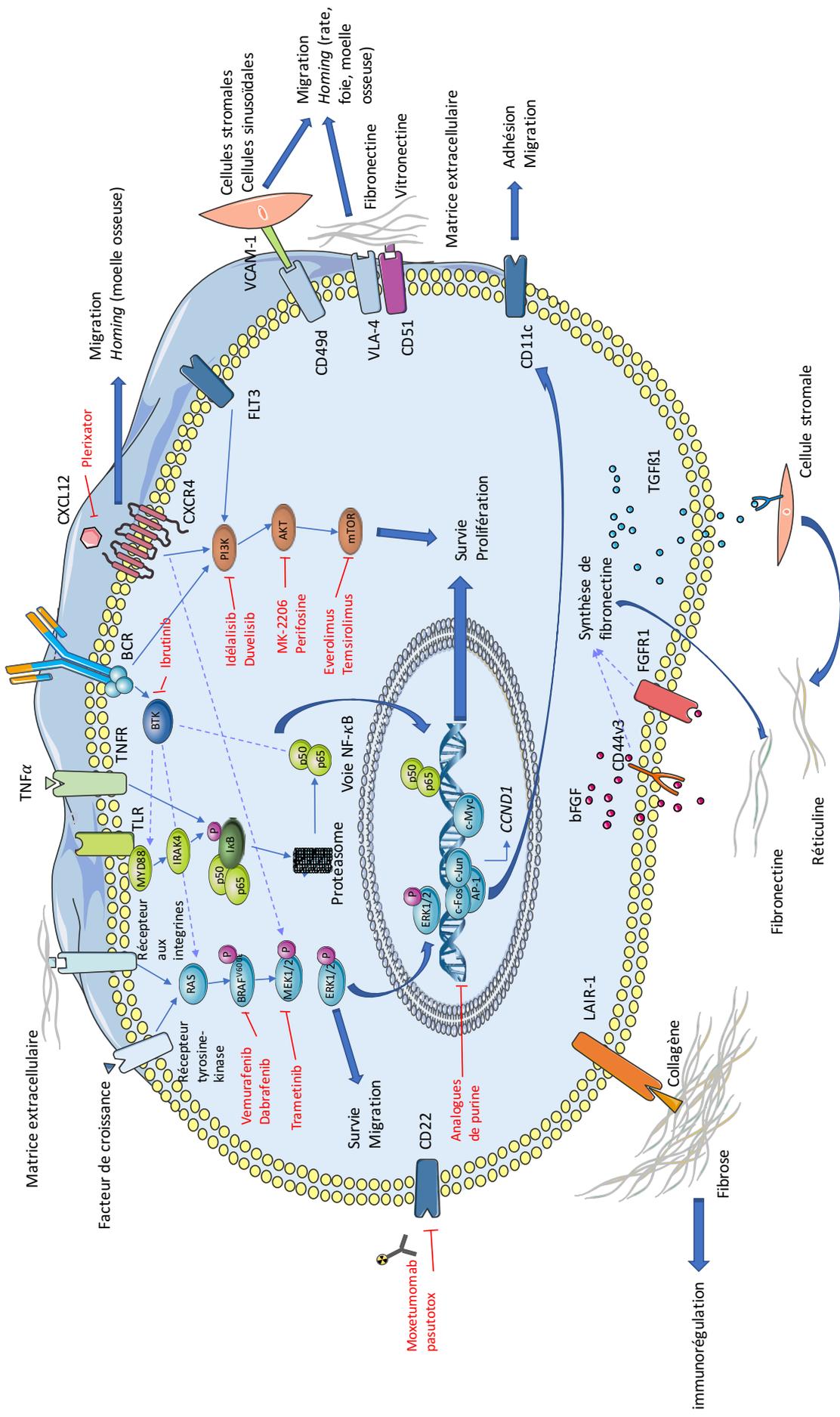


Figure 4 | Voies cellulaires

Représentation schématique des différentes voies cellulaires impliquées dans le tricholeucocyte. Réalisé d'après [34,40,41]

La fibrose médullaire est liée à plusieurs mécanismes :

- la liaison autocrine du bFGF (*basic fibroblast growth factor*) au récepteur FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor 1*), surexprimé dans l'HCL-c, induit la synthèse de fibronectine [42]
- de même, la liaison d'isoformes du CD44 au hyaluronane ou au bFGF promeut la synthèse de la fibronectine [43]
- enfin la sécrétion du TGF- β 1 (*Transforming growth factor 1*) induit le dépôt de réticuline par les fibroblastes [44].

Chez les patients atteints d'HCL-c, l'accumulation dans la moelle osseuse de composés non collagèneux (la fibronectine) et de composés collagèneux (la réticuline) est à la base du processus complexe de fibrose médullaire [44] (Figure 4).

LAIR-1 (CD305) est un récepteur inhibiteur fortement exprimé dans l'HCL [45], il est exprimé de manière ubiquitaire dans les lymphocytes notamment dans les lymphocytes B immatures et B naïfs [46]. En se liant au collagène il exercerait des propriétés inhibitrices sur les cellules effectrices anti-tumorales comme les lymphocytes T et NK ainsi que sur les monocytes [46]. Son rôle dans les lymphocytes B et l'HCL est mal connu mais pourrait expliquer l'immunodépression.

La cytokine TNF α (*Tumor necrosis α*) est exprimée de manière autocrine par le tricholeucocyte (Figure 4). Sa liaison au récepteur au TNF α (TNR) induit l'activation de la voie NF-kB [40].

2-4. Voie PI3k/Akt/mTOR

Les propriétés de survie et de prolifération du tricholeucocyte ne sont pas liées à l'unique dérégulation de la voie des MAPK. Des voies cellulaires bien connues dans la lymphopoïèse B sont aussi impliquées comme la voie PI3k/Akt/mTOR (phosphatidylinositol 3 kinase/*protein kinase B/mammalian target of rapamycin*). Les kinases Akt et mTOR ont un rôle dans la prolifération et la protection contre l'apoptose et sont classiquement activées par la stimulation du récepteur des lymphocytes B

(BCR) [47]. D'autre part, le récepteur CD135 (FLT3) surexprimé dans l'HCL [22], active la voie PI3k/Akt/mTOR [48] (Figure 4).

2-5. Voie NF κ -B

La voie du NF κ -B (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) est une voie pléiotropique du lymphocyte B, en interagissant dans l'apoptose, la prolifération, la motilité et l'inflammation. La voie du NF κ -B semble avoir un rôle central dans l'activation du tricholeucocyte [49]. En effet, l'étude *in silico* de l'expression des gènes dans l'HCL montre une up-régulation des gènes régulés par la voie NF κ -B [49].

La voie NF κ -B est activée de manière canonique par la liaison de ligands aux récepteurs de type *Toll like receptor* ou le récepteur au TNF α , qui vont recruter des effecteurs et phosphoryler l'inhibiteur i- κ B. Cette phosphorylation va adresser i- κ B vers le protéasome pour être dégradé et libérer ainsi les protéines p50 et p65. Ces dernières vont transloquer dans le noyau pour réguler l'expression des gènes cibles de la voie NF κ -B (Figure 4). D'autre part, le BCR peut aussi activer la voie NF κ -B.

2-6. Voie du BCR

Le récepteur des lymphocytes B est primordial dans l'activation du lymphocyte B. Le BCR est composé de chaînes d'immunoglobulines extra-membranaires associées à des chaînes intracellulaires α et β (CD79a et CD79b), formant un hétérodimère indispensable à la transduction du signal [50]. La structure de la chaîne d'immunoglobuline du BCR est composée de chaînes lourdes (μ ou γ) et de chaînes légères kappa (κ) ou lambda (λ). La région intracellulaire du BCR est reliée aux protéines kinases : la spleen tyrosine kinase (SYK), la *Lck/Yes Novel* tyrosine kinase (LYN) et la Bruton tyrosine kinase (BTK). Physiologiquement la liaison d'un antigène au BCR va activer SYK, LYN et BTK qui vont exercer un rôle pléiotrope sur la survie et la prolifération notamment au travers des voies NF- κ B et PI3k/Akt/mTOR.

Dans le cadre d'une hémopathie lymphoïde B, le BCR est activé par le microenvironnement cellulaire apportant ainsi un support à la prolifération [50].

Les régions variables des chaînes lourdes du BCR sont codées par le gène *IGHV* (*Immunoglobulin Heavy chain Variable*) situé sur le chromosome 14 et sont directement impliquées dans la reconnaissance de l'antigène. Les combinaisons de recombinaisons des segments : V_H (variable), D_H (Diversité), J_H (jonction) et C (domaine constant) sont multiples et nommées selon les segments impliqués (Figure 5).

La diversité du répertoire du BCR est médiée par la multiplicité des recombinaisons $V_H D_H J_H$ possible, des modifications nucléotidiques (insertion/délétions) dans les domaines de jonction et l'accumulation de mutations dans le segment V_H (aussi appelée hypermutations somatiques) (Figure 5) [50].

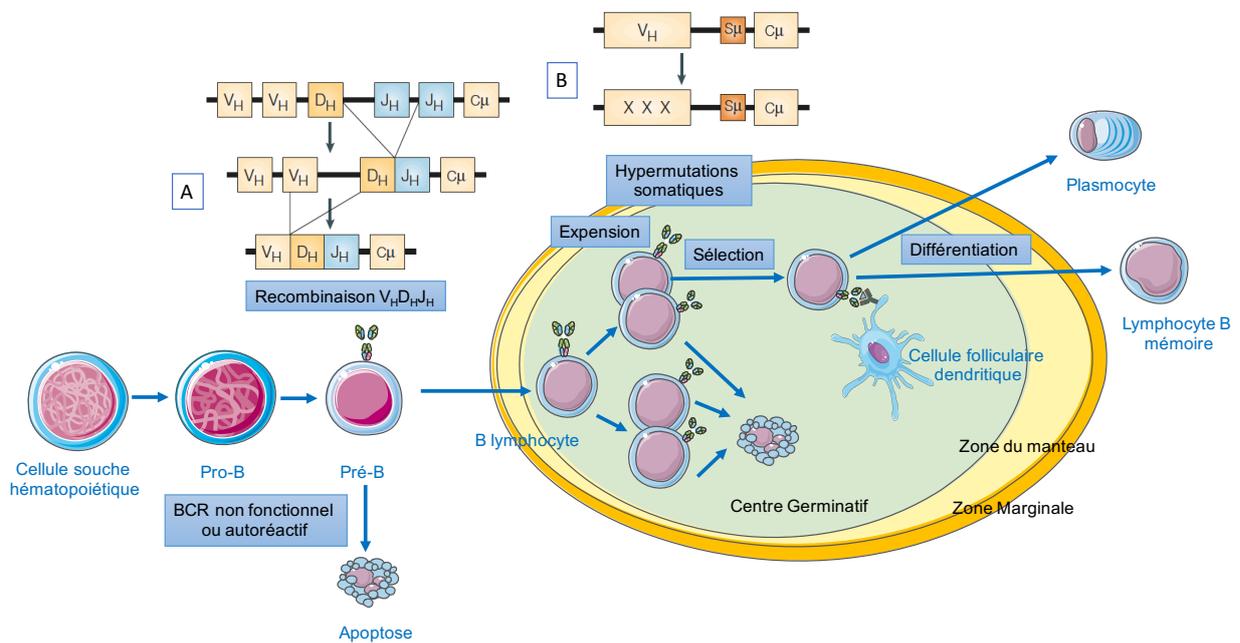


Figure 5 | Processus de recombinaison et hypermutation du BCR

A) La recombinaison est initiée par le réarrangement des segments D_H et J_H du BCR. Puis un réarrangement $V_H D_H J_H$ dit « complet » du BCR permet au lymphocyte B de poursuivre sa maturation.
 B) Le lymphocyte B va migrer dans le ganglion où une expansion va se produire puis une étape d'hypermutation des *IGHV* va permettre la sélection du clone le plus affiné pour l'antigène (X représente les mutations dans le segment V_H). Réalisé d'après [50].

Un individu sain aura une répartition homogène de l'ensemble des réarrangements du BCR et ses lymphocytes B seront dits polyclonaux. Dans le cadre d'une leucémie, une cellule lymphoïde B prolifère anormalement, le répertoire des *IGHV* sera donc restreint avec l'apparition d'une population majoritaire ayant le même réarrangement *IGHV*, cette population sera dite clonale.

D'autre part, l'affinité du BCR pour l'antigène est améliorée par l'hypermutation somatique des *IGHV*. Le statut hypermuté du BCR est défini par une variation >2% des nucléotides par rapport à un ADN de référence *germline*. Des *IGHV* non mutées reflètent donc une origine cellulaire plus précoce et sont associées à un moins bon pronostic [51]

2-7. Tricholeucocyte : une cellule à haute instabilité génétique

Le tricholeucocyte est une cellule à haute instabilité génétique. L'analyse du caryotype par cytogénétique conventionnelle rapporte de nombreuses anomalies qui sont peu homogènes selon les séries[52,53]. On peut cependant noter que la délétion du bras long du chromosome 7 (Del7q), impliquant le gène *BRAF*, est décrite dans 20% des cas d'HCL-c et HCL-v [54].

En 2011 l'équipe de Tiacci *et al.* [30] a découvert la mutation p.V600E dans l'exon 15 du gène *BRAF* chez 5 patients atteints d'HCL, cette mutation a été confirmée depuis sur des cohortes plus larges. Ainsi 80 à 100% des HCL-c ont la mutation *BRAF*^{V600E} [55–57]. Classiquement, les tricholeucocytes présentant la mutation *BRAF*^{V600E} sont associés à un BCR muté [55]. L'analyse du répertoire des *IGHV* a montré des préférences pour les réarrangements de type VH3 de la région variable des chaînes lourdes avec notamment VH3-23 et 3-30 [57].

Il existe de rares cas où les tricholeucocytes n'ont pas la mutation *BRAF*^{V600E}. Dans ces cellules, le réarrangement VH4-34 est retrouvé majoritairement, il est associé à un BCR non muté et la présence de mutation de *TP53* [51,57]. Dans une récente étude, les HCL-c *BRAF*^{WT}, présenteraient essentiellement des mutations dans le gène *MAP2K1* (6/7) induisant aussi une activation de la voie des MAPK [58]. Les HCL-c

III. Diagnostic : données clinico-biologiques

1. *Présentation clinique*

La leucémie à tricholeucocytes est une maladie d'évolution lente et insidieuse. La découverte de la maladie peut être fortuite. Le diagnostic peut se faire suite à des infections atypiques liées à l'immunodépression, ou à des symptômes tels que l'altération de l'état général (asthénie, anorexie, amaigrissement) ou liés à l'augmentation du volume de la rate. La médiane d'âge au diagnostic est de 55 ans avec un ratio homme/femme de 3,9 pour 1 [9,10]. La splénomégalie est retrouvée dans presque 90% des cas. L'envahissement ganglionnaire est atypique et décrit dans seulement 13% des cas au diagnostic, son incidence augmentant avec la rechute [9].

2. *Examens biologiques utiles*

Le diagnostic de la leucémie à tricholeucocytes repose sur une compilation d'arguments clinico-biologiques et la détection des cellules lymphomateuses dans le sang ou la moelle osseuse. L'envahissement médullaire par les tricholeucocytes, la fibrose associée et l'hypersplénisme vont entraîner des cytopénies voire une pancytopenie, détectable sur une numération formule sanguine (NFS). Une anémie modérée et une neutropénie sont retrouvées dans la majorité des cas, presque constamment associées à une monocytopenie [9]. Un examen attentif du frottis sanguin permet de mettre en évidence la présence de cellules atypiques circulantes.

2-1. Cytologie

Les tricholeucocytes sont des cellules de taille moyenne à grande. Le cytoplasme est légèrement basophile, abondant, avec des villosités périphériques

circonférentielles. Le noyau est rond, ovale ou réniforme, avec une chromatine sablée, homogène, mature et inconstamment nucléolée (Figure 7A).

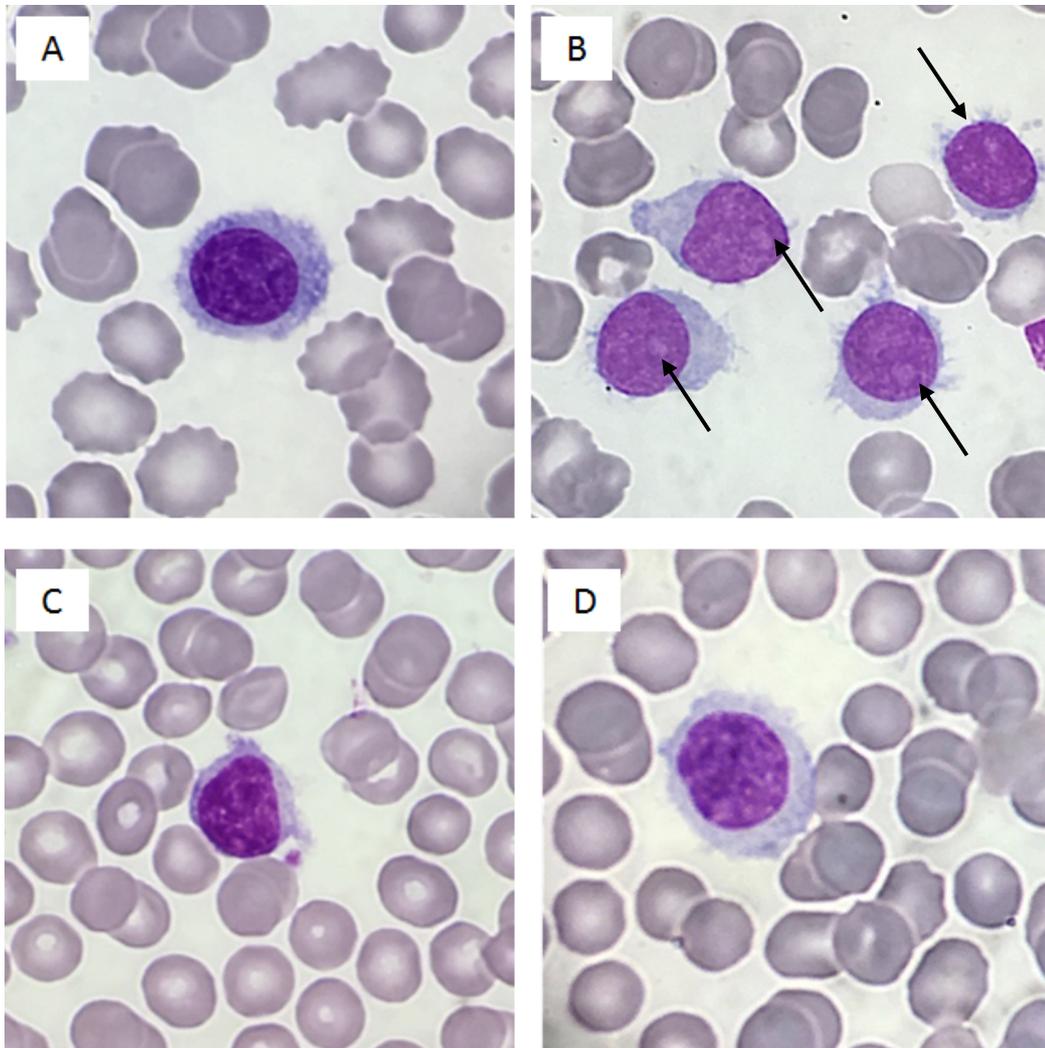


Figure 7 | Lymphocytes chevelus

A) Tricholeucocyte dans sa forme classique, noyau rond avec une chromatine homogène et des villosités fines et circonférentielles. B) Tricholeucocyte dans sa forme variante, on note la présence d'un nucléole proéminent (flèches). C) Lymphocyte atypique d'un lymphome splénique de la zone marginale, chromatine dense, avec des villosités polaires à base large. D) Lymphocyte de lymphome splénique diffus de la pulpe rouge, avec un noyau rond, une chromatine mature non mottée et de fines villosités circonférentielles. Coloration au May Grünwald Giensa x1000 (CHU de Caen).

La présence des villosités dans cette cellule n'est toujours pas élucidée. Des protéines de la famille des Rho GTPases ont précédemment été associées au

phénotype vilieux, telles que Cdc42 et Rac1. En effet, ces deux protéines sont surexprimées dans des lignées cellulaires d'HCL ; et un traitement par interféron α , qui les down-régule, lisse la membrane cellulaire [35]. D'autres études suggèrent l'implication de GAS7 ou CD9 dans le mécanisme de formation de villosités, car ces protéines, surexprimées dans l'HCL, sont associées aux microfilaments neuronaux [22,42]. Plus récemment, l'utilisation *ex vivo* d'un inhibiteur de la voie des MAPK, le vemurafenib, a montré une réversion du phénotype vilieux, et est corrélé à la down-régulation d'ACTB (β -actine) et de LST1, tous deux impliqués dans le cytosquelette [64]. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez un patient (1/50) traité par vemurafenib [65]. Ces données suggèrent le probable rôle de la voie MAPK dans la morphologie des tricholeucocytes.

2-2. Anatomopathologie

L'examen histologique des pièces de la biopsie ostéo-médullaire est utile pour quantifier la fibrose médullaire. L'histologie retrouve une infiltration interstitielle caractéristique, par des cellules d'aspect dit en « œuf sur le plat » avec un noyau rond ou ovale entouré par un cytoplasme abondant. L'examen immunohistochimique met en évidence une infiltration par des cellules lymphoïdes B (CD20+). Il existe des marqueurs spécifiques de la maladie comme la positivité de l'annexine A1, de la cycline D1, la résistance à la tartrate acide ATPase (TRAP), et plus récemment l'utilisation d'un anticorps anti *BRAF*^{V600E} [66].

L'examen de la biopsie ostéo-médullaire (BOM) et l'évaluation de la réponse au traitement par immunohistochimie est parfois complexe. En effet, il existe de nombreuses interactions entre le traitement et le marquage [64,67] :

- L'utilisation du rituximab (anticorps monoclonal anti CD20) négative le CD20
- Le vemurafenib down-régule l'expression de la cycline D1 et le CD25.
- L'annexine A1 est positive sur les cellules myéloïdes et peut rendre complexe l'interprétation en cas de faible infiltration tumorale

Lors d'une splénectomie, l'examen de la pièce anatomique montre une infiltration intra-sinusoïdale de la pulpe rouge au détriment de la pulpe blanche [66]. Il est aussi

reporté un aspect de « plage de sang » (appelé *blood lake*-) entouré par les cellules tumorales, correspondant à une extravasation des érythrocytes [68].

2-3. Immunophénotypage par cytométrie en flux

Le tricholeucocyte exprime les marqueurs lymphoïdes B avec une intensité forte (CD19^{High}, CD20^{High}, CD22^{High}). On retrouvera une restriction isotypique des chaînes légères des immunoglobulines kappa ou lambda, ainsi que la co-expression pathognomonique de 4 marqueurs CD103, CD123, CD25 et CD11c (Figure 8) [69]. Un score phénotypique est basé sur ces quatre marqueurs avec un point accordé en cas de positivité. La leucémie à tricholeucocytes dans sa forme classique a un score $\geq 3/4$ dans 98% des cas [69].

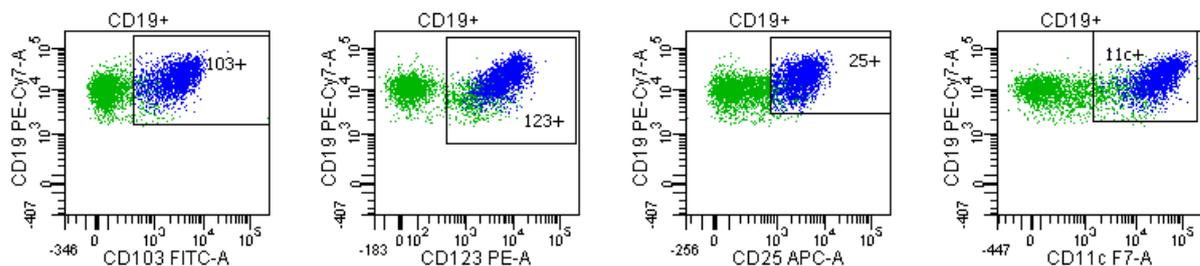


Figure 8 | Immunophénotypage d'un cas de leucémie à tricholeucocytes

Représentation en cytogrammes bi-paramétriques, de l'immunophénotypage par cytométrie en flux, des lymphocytes d'un patient atteint d'HCL-c. Tricholeucocytes (population bleue), lymphocytes B normaux résiduels (population verte) (BD FACS Canto II®, 8 couleurs, laboratoire d'Hématologie, CHU de Caen)

Le CD103 est une intégrine (rôle dans l'adhésion) exprimée par les lymphocytes T innés et les lymphocytes T régulateurs. Son expression dans les hémopathies lymphoïdes B est quasiment nulle, ce qui en fait un marqueur d'intérêt dans le diagnostic de l'HCL [70,71].

Le CD123 correspond à la chaîne α du récepteur à l'interleukine 3 (IL-3R), son expression est retrouvée physiologiquement dans certaines cellules myéloïdes

(monocytes, cellules dendritiques, polynucléaires éosinophiles et basophiles) et les lymphocytes T. Dans les lymphoproliférations à lymphocytes chevelus, l'expression forte du CD123 est caractéristique de l'HCL-c [72]. Dans un modèle cellulaire murin, l'interleukine 3 semble promouvoir l'expression de VLA-4 et ainsi l'adhésion des cellules à la moelle osseuse [37]. Le CD123 a ainsi probablement un rôle dans le *homing* médullaire.

Le CD25 (sous unité α du récepteur à l'interleukine 2) est un marqueur de l'activation lymphocytaire T et B.

Enfin le CD11c est une intégrine exprimée préférentiellement sur les monocytes et les granuleux. Sa forte expression dans l'HCL a été reliée directement à AP-1 (*Activator protein 1*) elle-même activée par la voie des MAPK (Figure 5) [28]. L'intensité d'expression du CD11c est utile au diagnostic différentiel avec les autres lymphoproliférations à lymphocytes chevelus (Tableau 1).

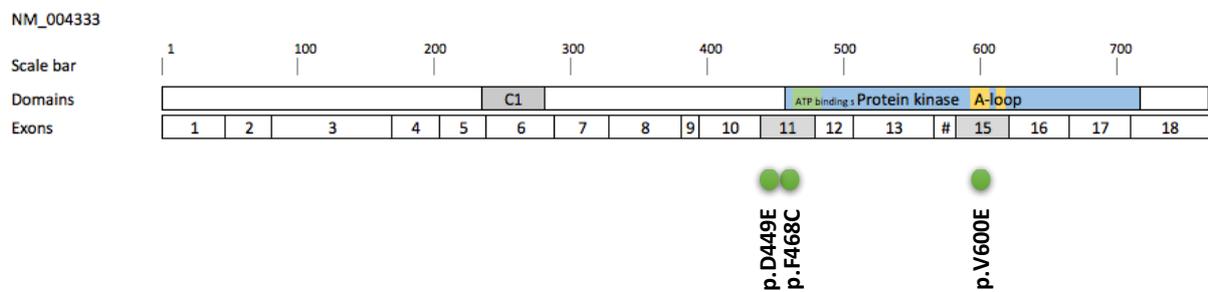
Les tricholeucocytes ont aussi la particularité de ne pas exprimer le CD27, un marqueur spécifique des cellules B mémoires [23]. On note cependant une sur-expression du CD200 et du CD180 dont le ratio de fluorescence CD200/CD180 semble être utile au diagnostic différentiel [73]. De rares cas avec une expression du CD5 ont été décrits [74,75], alors que la positivité du CD10 est plus fréquente (10 à 20% des cas) [75–77]. Comme dans la LLC, une expression du CD38 semble être de mauvais pronostic [78].

2-4. Biologie moléculaire

2-4-1. Voie des MAPK : BRAF et MAP2K1

Le gène BRAF est localisé dans le chromosome 7 au locus 34 du bras long (7q34). 80 à 100% des HCL-c sont associées à la mutation hétérozygote *BRAF*^{V600E} (NM_004333:c.1799T>A,p.V600E) [57,79]. Cette mutation se trouve dans l'exon 15 du gène *BRAF* dans la zone catalytique du domaine tyrosine kinase (Figure 9). La substitution d'une valine par un acide glutamique entraîne l'activation constitutive du domaine kinase par phospho-mimétisme [31].

La mutation *BRAF*^{V600E} est caractéristique de l'HCL mais non spécifique. En effet cette mutation est retrouvée dans des cancers solides dont plus de 30% des mélanomes [80]. La mutation *BRAF*^{V600E} est aussi décrite dans d'autres hémopathies : 4% des cas de myélomes multiples, 2% des cas de LLC et plus de 50% des cas d'histiocytoses langerhansiennes [32,81,82]. Des mutations alternatives dans l'exon 11 ont aussi été mises en évidence dans l'HCL-c [83]. Il est nécessaire de rechercher des mutations dans *BRAF*, d'une part pour parfaire le diagnostic et d'autre part pour l'utilisation potentielle d'agents thérapeutiques ciblant cette anomalie.



Légende : ● Variation faux-sens, en gris sont représentés les exons séquencés dans le Trichopanel

Figure 9 | Représentation schématique de la localisation des mutations dans le gène *BRAF*
Réalisé d'après [30,83].

Il existe de rares cas où les tricholeucocytes n'ont pas de mutation dans *BRAF*. Dans ce cas, des mutations dans le gène *MAP2K1* doivent être recherchées [58]. *MAP2K1* code pour la kinase MEK1 l'effecteur direct de *BRAF* (Figure 3). Les HCL-c *BRAF*^{WT} sont de moins bon pronostic car elles répondent moins bien aux traitements classiques (cladribine, pentostatine). Cependant la présence de mutation dans *MAP2K1* peut rendre éligible à l'utilisation de thérapies ciblées [57].

2-4-2. Statut des IGHV

La forme classique de la leucémie à tricholeucocytes est associée à un BCR muté [84]. L'analyse du répertoire des *IGHV* a montré des préférences pour les réarrangements de type VH3 de la région variable des chaînes lourdes ; notamment VH3-23 et 3-30 [57]. A l'inverse, les HCL-c *BRAF*^{WT}, ont préférentiellement le réarrangement VH4-34 et un BCR non muté [57]. La recherche du statut mutationnel des *IGHV* et leur réarrangement n'est actuellement pas réalisé en routine sauf en cas de diagnostic difficile ou de résistance au traitement [85].

2-4-3. Cycle cellulaire : TP53 et CDKN1B

Plusieurs gènes d'intérêts codants des protéines impliquées dans le cycle cellulaire peuvent être séquencés. Les deux gènes principaux dans l'HCL sont *TP53* codant pour la protéine p53 et *CDKN1B* codant pour p27. Lorsqu'une cellule entre en division, plusieurs étapes sont nécessaires et hautement régulées, notamment la phase G1/S (Figure 10). La protéine p53 autrement appelée « gardien du génome » peut entraîner l'arrêt de la prolifération *via* p21, réduisant ainsi la phosphorylation du rétinoblastome (RB). En cas de perte de fonction de p53 ou de p27, l'entrée en cycle n'est plus contrôlée et les cellules prolifèrent [86,87].

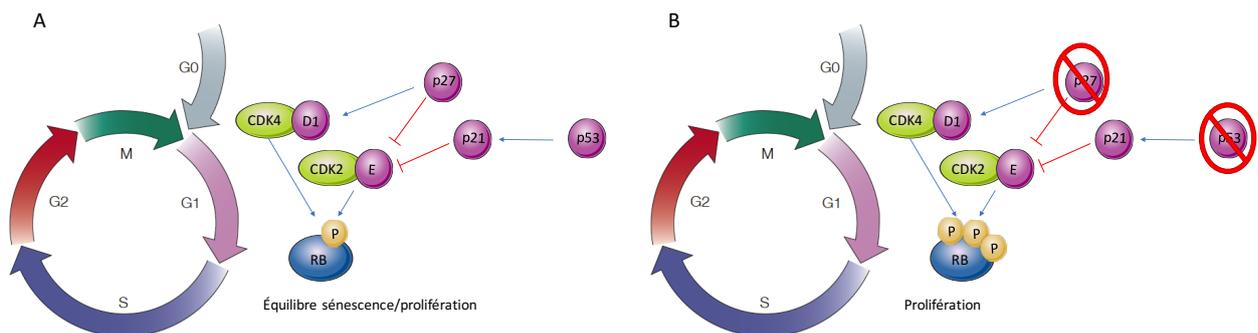


Figure 10 | Cycle cellulaire

La division cellulaire se déroule en différentes phases : G1/S/G2/M. Le passage de G1 à S est initié par les cyclines (notamment la cycline D1 (D1) et la cycline E (E)). La synthèse de la cycline D1 et son assemblage permet la séquestration de p27 et libère la cycline E de son inhibiteur. Les cyclines collaborent entre elles pour phosphoryler le rétinoblastome (RB). La perte de l'activité de p53 ou p27 entraîne une entrée en cycle incontrôlée et la prolifération des cellules. Modifié d'après [86,87].

Les altérations de fonctions de p53 peuvent intervenir à différents niveaux : des mutations inactivatrices de *TP53* ou des délétions du locus 13 du bras court du chromosome 17 (Del17p13). Dans les anciennes séries d'HCL-c, le taux de mutation de *TP53* a été reporté à 28% des cas et la Del17p13 dans 75% des cas [88,89]. Ces taux très élevés n'ont pas été retrouvés dans des séries plus récentes avec 0-3% de mutation et 0% de Del17p13 [51,54]. Cependant, compte-tenu de l'impact thérapeutique des mutations de *TP53* dans la LLC et la résistance aux alkylants [90], il est recommandé de séquencer *TP53* en cas de résistance aux premières lignes de traitement [85].

Les mutations inactivatrices du gène *CDKN1B* ont récemment été décrites dans plus de 10% des HCL-c [60,91] mais ne sont actuellement pas recherchées en routine.

2-5. Données pronostiques/prédictives

Selon les dernières recommandations internationales, outre les mutations de *TP53*, le statut des *IGHV* et l'absence de *BRAF*^{V600E}, plusieurs autres facteurs de mauvais pronostic doivent être recherchés [85]:

- Une anémie sévère (<100 g/L)
- Une splénomégalie >10 cm sous le rebord costal
- Un profil immunophénotypique atypique.

3. *Les entités frontières : un diagnostic différentiel difficile*

Le diagnostic différentiel des cas d'HCL *BRAF*^{V600E} négatifs est difficile et repose sur un ensemble de données clinico-biologiques résumées dans le tableau 1. Trois entités sont caractérisées par la présence de lymphocytes chevelus circulants et l'absence de la mutation *hotspot* *BRAF*^{V600E} [92]:

- le lymphome splénique de la zone marginale (SMZL),
- la leucémie à tricholeucocytes dans sa forme variante (HCL-v),
- le lymphome splénique diffus de la pulpe rouge (SDRPL).

Tableau 1 | Comparaison des données clinico-biologiques du diagnostic différentiel entre HCL-c, HCL-v, SDRPL et SMZL. Modifié d'après [51,54,57,63,84,91,93,93-98]

	HCL-c	HCL-v	SDRPL	SMZL
Incidence (pour 100000 hab)	0,3	0,2	nd	0,2
Survie globale (% pour 5 ans)	78-92%	57%	93%	83-91%
PRESENTATION CLINIQUE				
Sex-ratio (M/F)	4	1.6	1.6	0.5
âge médian (années)	55	70	77	62
Splénomégalie	Oui	Oui	Oui	Oui
Monocytopénie	Oui	Non	Non	Non
CYTOLOGIE				
Villosités	Longues fines et circonférentielles	Longues fines et circonférentielles	Longues, base large, circonférentielles	Petites, polaires
Nucléole	Occasionel discret	Constant, proéminent	Occasionel	Petit
Chromatine	Mature, homogène	Condensée	Condensée	Lègèrément mottée
IMMUNOPHENOTYPE et HISTOLOGIE				
Annexine A1	+	-	-	-
CD11c	+ FORT	+ (63%)	+ (>90%)	+ dim (33-67%)
CD25	+ FORT	- (>90%)	- (>90%)	- (78-88%)
CD103	+ FORT	+ (65-100%)	- (62-84%)	- (>90%)
CD123	+ FORT	- (60%)/dim	- (50-84%)	- (75%)/dim
CD27	- (>90%)	nd	- (81%)	+ (89%)
CD180	+	nd	+ FORT	+
CD200	+ FORT	-	-	-
BOM (infiltration)	IS, fibrose	IN, IS, fibrose	IN, IS, fibrose	IS, N
Rate (infiltration)	PR	PR	PR	PB: nodulaire
CYTOGENETIQUE et BIOLOGIE MOLECULAIRE				
Caryotype anormal	40%	rare, caryotype complexe	30%	80%
Anomalies chromosomiques récurrentes	del17p, +12, del7q	del17p, +12, Del7q	+3, del7q	+3, +18, del7q
IGHV mutés (%)	83-90%	46-73%	79%	59-68%
répertoire IGVH (frq>10%)	VH3-30, VH3-23, VH4-34	VH4-34	VH4-34, VH3-23	VH1-2, VH4-34
<i>BRAF</i> ^{V600E}	+	-	-	-
MAP2K1 mutations	0-18,5%	9-48%	10,5%	nd
CKDN1B mutations	11-16%	0%	nd	nd
NOTCH1 mutations	nd	nd	10,5%	5%
NOCH2 mutations	0%	nd	0-3%	17-21%
TP53 mutations	0-28%	25%	0-5%	13,5-25%
KLF2 mutations	10-17%	nd	nd	42%
CCND3 mutations	nd	13%	21-24%	13%
MLL3 mutations	15%	25%	nd	nd

Abréviations : HCL-v : Hairy cell leukemia variant, SDRPL : Splenic diffuse red pulp lymphoma, SMZL : Splenic diffuse marginal zone lymphoma, HCL-c : classical Hairy cell leukemia. + : positif (% de cas positifs), - : négatif (% de cas négatifs), dim : expression faible. IN interstitial, IS intrasinusoidal, N nodulaire PR : Pulpe rouge, PB : Pulpe Blanche

3-1. Lymphome splénique de la zone marginale

Le diagnostic de certitude du SMZL repose sur l'analyse histologique des tissus envahis (rate, biopsie de moelle osseuse). Cependant, afin d'éviter des examens invasifs dans un pathologie indolente, l'association de la cytologie,

l'immunophénotypage et des analyses de biologie moléculaire peuvent orienter vers ce diagnostic. En effet :

- des mutations dans *KLF2* sont retrouvées dans près de 42% des SMZL et moins de 20% des cas d'HCL-c [99],
- des mutations dans *NOTCH2* sont retrouvées dans 20% des SMZL et aucun cas d'HCL-c [63,99–101],
- il a été observé une utilisation préférentielle du VH1-2 du répertoire des *IGHV* dans un tiers des cas [102]. L'utilisation du répertoire VH3-23 et VH3-30 est décrit dans moins de 10% des cas [94].
- le profil immunophénotypique des SMZL diffère des autres entités de par l'expression faible du CD11c, une expression moyenne du CD180 et un CD200 négatif [73,103].

Le SMZL évolue de manière indolente et est de bon pronostic [92].

3-2. Forme variante de la leucémie à tricholeucocytes /lymphome diffus de la pulpe rouge

L'HCL-v et le SDRPL, sont deux entités provisoires selon la classification OMS de 2008 révisée en 2016 [55,92]. Elles partagent de nombreuses caractéristiques communes [92,96,103]. Leur différence majeure repose sur la cytologie : présence d'un nucléole proéminent retrouvé de manière constante dans le noyau de l'HCL-v alors qu'il n'est décrit que rarement dans le SDRPL (Figure 7B et 7D). Leurs profils phénotypiques et génétiques ne permettent pas de les distinguer aisément. Ainsi des mutations de *MAP2K1* décrites initialement dans 42% des HCL-v sont retrouvées dans près de 10% des SDRPL [58]. Cependant, il est décrit une différence notable dans la proportion de mutations dans *TP53* retrouvée dans près de 30% des HCL-v et seulement 0 à 5% des SDRPL [58,96,103]. Cette dernière donnée est à corréliser avec le mauvais pronostic de l'HCL-v qui est résistante aux analogues de purines alors que le SDRPL a une évolution plus indolente. Certains auteurs suggèrent que l'HCL-v serait la forme transformée du SDRPL [103]. Ainsi, compte-tenu de la différence de prise en charge et du pronostic, la distinction de ces entités est primordiale.

4. *Prise en charge thérapeutique*

Un consensus de recommandation a récemment été rédigé par un groupe experts internationaux. Les patients atteints d'HCL-c sont traités en cas de manifestations symptomatologiques de leur maladie :

- fièvre, sueurs nocturnes, splénomégalie massive, infections...,
- syndrome anémique (hémoglobine <110 g/L),
- syndrome hémorragique ou thrombopénie <100 G/L
- neutropénie (polynucléaires neutrophiles <1 G/L) [85].

Le type de chimiothérapie de première ligne recommandée est la classe des analogues de purine tel que la cladribine ou la pentostatine. Ces molécules ont une efficacité similaire en terme de réponse, mais elles ont des effets secondaires et un schéma d'administration différents [104]. Le choix sera décidé au cas par cas.

L'évaluation de la réponse au traitement sera réalisée par un examen clinique, la réalisation d'une NFS/immunophénotypage et d'une BOM. L'amélioration des paramètres hématologiques (hémoglobine >110 g/L, plaquettes >100 G/L et polynucléaire neutrophiles >1,5 G/L), la régression de la splénomégalie et l'absence de tricholeucocytes dans le sang et la BOM sont nécessaires pour définir une réponse complète. Si la diminution de la splénomégalie est de 50% avec une amélioration des paramètres hématologiques et une diminution de 50% de l'infiltration tumorale de la BOM, on dira que la réponse est partielle. Dans cette situation, un second cycle d'analogues de purines associé au rituximab est possible. La progression de la maladie est définie par une exacerbation des symptômes, une aggravation des paramètres hématologiques de plus de 25% ou l'augmentation de la rate de plus de 25%.

Les rechutes sont assez fréquentes, 30 à 40% des cas [105]. En cas de rechute, les critères de traitement restent identiques. Une seconde cure d'analogue de purine peut être envisagée avec une réponse attendue similaire à celle obtenue en première ligne [106,107].

Cependant une rechute précoce (<24 mois) devra être traitée par des thérapies alternatives (essais cliniques, splénectomie...), et des facteurs de mauvais pronostic seront recherchés.

Des nouvelles thérapies ont révolutionné la prise en charge de l'HCL-c (Figure 11).

Ainsi l'inhibiteurs de BRAF (vemurafenib) a un taux de réponse globale de 96-100% chez les patients en rechute, avec une réponse complète dans 35 à 42% des cas [65,108]. Cependant, des mécanismes de résistance peuvent apparaître et outrepasser l'inhibiteur de BRAF. Il a ainsi été décrit l'acquisition d'une mutation dans le gène *KRAS* en amont de *BRAF* chez un patient en rechute après un traitement par vemurafenib [65]. Des molécules inhibant MEK (trametinib) ont été développées et utilisées avec succès dans le mélanome. La combinaison d'inhibiteurs de BRAF et de MEK a été testée sur des mélanomes métastatiques avec une amélioration du taux de réponse [109]. Une étude *in vitro* a mis en évidence la supériorité de l'association par rapport à un traitement par un seul des inhibiteurs [64]. Cette combinaison est actuellement utilisée en essai clinique de phase II dans l'HCL-c.

D'autres stratégies de traitement peuvent être utilisées comme la combinaison d'un anticorps anti CD22 couplé à une toxine pyocyanique : le moxetumomab-pasudotox. Dans une étude clinique de phase I, la réponse globale était de 86% (taux de rémission complète à 46%) [110].

Le BCR peut aussi être ciblé par l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine BTK (ibrutinib). Dans l'HCL, une étude *in vitro* a montré un effet intéressant de l'ibrutinib sur la prolifération. De manière étonnante une meilleure sensibilité serait retrouvée sur les cellules *BRAF*^{V600E} négatives [41]. Les résultats intérimaires d'un essai clinique de phase II sur 13 patients en rechute ou réfractaires, met en évidence un taux de réponse globale de 46% avec une seule réponse complète [111].

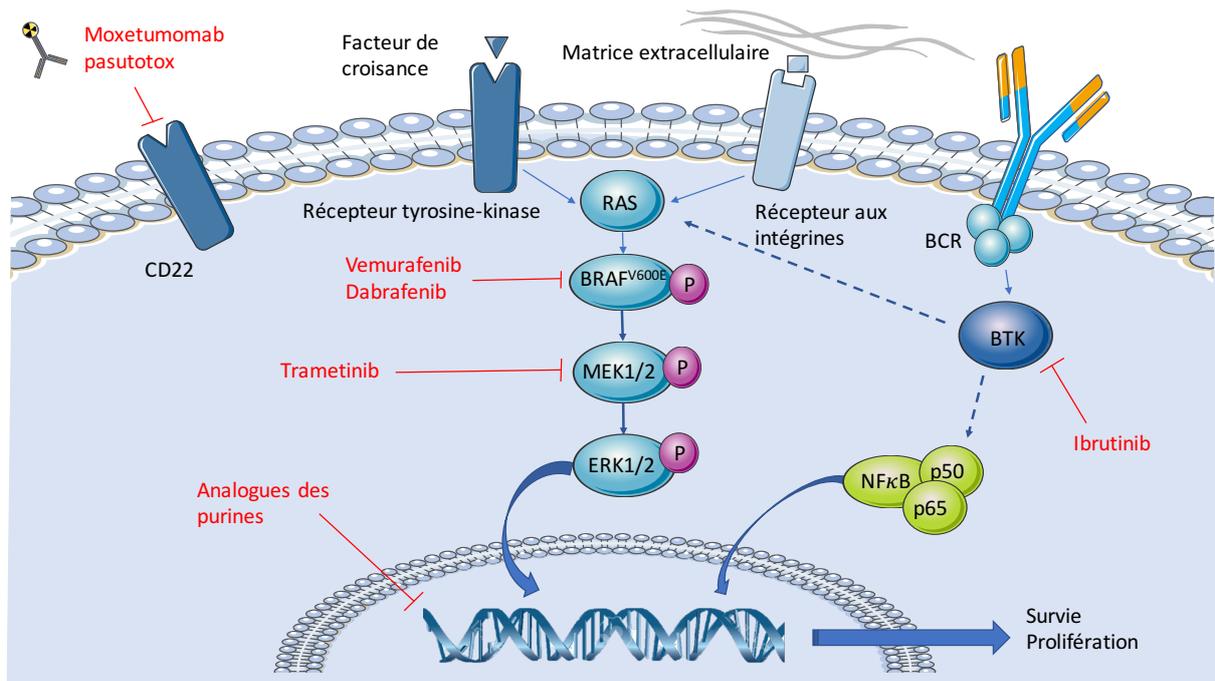


Figure 11 | Cibles thérapeutiques dans l'HCL-c

Les cibles thérapeutiques sont représentées en rouge. Réalisé d'après [32,41]

5. Apport du séquençage à haut débit dans les hémopathies : définition du Trichopanel

Les techniques de séquençage haut débit, ont révolutionné la prise en charge biologique des hémopathies, en permettant de séquencer un nombre important de gènes, en parallèle, pour une pathologie donnée. La signature moléculaire des hémopathies, déterminée par ces techniques, a mis en évidence l'intérêt de certaines mutations dans le diagnostic et le pronostic.

5-1. « Lymphopanel » : origine et intérêt

Dans le cadre des lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) l'élaboration d'un « Lymphopanel » par l'équipe INSERM 1245 « *Genomics and Biomarkers of lymphoma and solid tumors* », a permis la distinction des différents sous types de DLBCL : centro-germinatif (GC), non centro-germinatif (ABC) et lymphome à grandes

cellules B primitif du médiastin (PMBL) ; ainsi que la description de facteurs prédictifs de la réponse thérapeutique [112]. C'est en prenant appui sur ce modèle que nous avons développé le « Trichopanel ».

5-2. Choix des gènes du « Trichopanel »

L'analyse des quatre études de WES publiées [30,58–60] a permis de définir des gènes d'intérêts pour le séquençage NGS (Figure 6 et Tableau 2). Ils ont été sélectionnés selon les critères suivants :

- la fréquence des mutations dans les gènes concernés d'après les études de WES,
- la présence de mutations récurrentes, de zones *hotspot*, ou de SNV localisés dans des séquences codant des domaines fonctionnels de la protéine,
- la fonction des protéines mutées dans les différentes voies de signalisation et de l'oncogenèse (voie des MAPK, cycle cellulaire, apoptose, épigénétique),
- la description dans la littérature de ces gènes dans des pathologies proches de l'HCL (SMZL et LLC notamment).
- l'absence de mutations dites « faux-positif » d'après la littérature [61].

Tableau 2 | Résumé des différentes mutations retrouvées dans les études de WES [30,58–

60]

	Fréquence WES		SNV	Rôle de la protéine codée/Voie cellulaire
	HCL n=12	HCL-v n=7		
<i>BRAF</i>	10	0	Faux-sens	Voie MAPK
<i>CDKN1B</i>	3	0	Non-sens, Faux-sens et frameshift	Régulation du cycle cellulaire
<i>MAP2K1</i>	2	3	Faux-sens	Voie MAPK
<i>ARID1A</i>	2	1	Faux-sens et frameshift	Régulation épigénétique
<i>TTN</i>	2	1	Faux-sens et non-sens	Protéine du muscle strié
<i>ARID1B</i>	2	0	Faux-sens et frameshift	Régulation épigénétique
<i>CREBBP</i>	2	0	Faux-sens et frameshift	Régulation épigénétique
<i>MUC5B</i>	2	0	Faux-sens	Famille des mucines, rôle dans la composition du mucus
<i>KDM6A</i>	2	0	Non-sens	Régulation épigénétique
<i>KIAA1755</i>	2	0	Faux-sens	Rôle inconnu
<i>RGS22</i>	2	0	Faux-sens et délétion <i>inframe</i>	Inhibition la transduction du signal GTP-dépendant
<i>PCLO</i>	2	0	Faux-sens	Rôle dans la formation de vésicules pré-synaptiques
<i>MAGI1</i>	1	1	Faux-sens et frameshift	Rôle dans la jonction cellule-cellule
<i>ABCA8</i>	1	1	Faux-sens	Transport transmembranaire
<i>SPIG1</i>	1	1	Faux-sens	Rôle dans l'endocytose
<i>TP53</i>	0	2	Faux-sens	Régulation du cycle cellulaire
<i>U2AF1</i>	0	2	Faux-sens	Régulation de l'épissage
<i>TMCO4</i>	0	2	Faux-sens et frameshift	Rôle inconnu
<i>DUSP2</i>	1	0	Non-sens	Voie MAPK
<i>MAPK15</i>	1	0	Faux-sens	Voie MAPK
<i>EZH2</i>	1	0	Frameshift	Régulation épigénétique
<i>XPO1</i>	1	0	Faux-sens	Transport nucléaire
<i>BCOR</i>	1	0	Non-sens	Différenciation

Légende : 18 gènes ont été pré-sélectionnés par leurs fréquences d'après les études de WES sur les HCL-c et HCL-v. Les 5 derniers gènes ont été sélectionnés de par leur intérêt dans la voie de signalisation MAPK (*DUSP2*, *MAPK15*) ou par leurs descriptions dans d'autres hémopathies lymphoïdes (*EZH2*, *XPO1*, *BCOR*).

Abréviations : SNV : small nucléotide variant, MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases, HCL-c leucémie à tricholeucocytes dans sa forme classique, HCL-v leucémie à tricholeucocytes dans sa forme variante, WES : Whole Exome Sequencing.

Nous avons choisi 21 gènes parmi lesquels nous avons ajouté 3 gènes utiles au diagnostic différentiel (Tableau 3). Les gènes ont été catégorisés selon leur fonction :

- voie des MAPK : *BRAF*, *MAP2K1*, *DUSP2*, *MAPK15*,
- régulation épigénétique : *ARID1A*, *ARID1B*, *EZH2*, *KDM6A*, *CREBBP*,
- apoptose/cycle cellulaire : *TP53*, *CDKN1B*, *XPO1*,
- domiciliation (*Homing*): *KLF2*, *CXCR4*,
- voie NOTCH : *NOTCH1*, *NOTCH2*,
- voie TLR/NF-κB : *MYD88*,
- inflammation : *ANXA1*,
- épissage : *U2AF1*,
- différenciation : *BCOR*,
- transport extracellulaire : *ABCA8*.

Tableau 3 | Liste des gènes séquencés dans le Trichopanel

Gène	Exons	RefSeq (NCBI)	Rôle/ Voie cellulaire
<i>BRAF</i>	15 et 11	NM_004333	Voie MAPK
<i>MAP2K1</i>	2-3	NM_002755.2	Voie MAPK
<i>MAPK15</i>	1-14	NM_139021	Voie MAPK
<i>DUSP2</i>	1-4	NM_004418	Voie MAPK
<i>ARID1A</i>	1-20	NM_006015	Régulation épigénétique
<i>ARID1B</i>	1-20	NM_020732	Régulation épigénétique
<i>CREBBP</i>	1-31	NM_004380	Régulation épigénétique
<i>EZH2</i>	2-20	NM_004456	Régulation épigénétique
<i>KDM6A</i>	1-29	NM_021140	Régulation épigénétique
<i>CDKN1B</i>	1-2	NM_004064	Cycle cellulaire
<i>TP53</i>	2-11	NM_000546	Cycle cellulaire
<i>ANXA1</i>	2-13	NM_000700	Inflammation
<i>BCOR</i>	2-15	NM_017745	Différentiation
<i>U2AF1</i>	2 et 6	NM_001025203/NM_006758	Régulation de l'épissage
<i>MYD88</i>	3-5	NM_002468	Voie TLR
<i>CXCR4</i>	1	NM_001008540	<i>homing</i>
<i>KLF2</i>	1-3	NM_016270	<i>homing</i>
<i>ABCA8</i>	2-38	NM_007168	Transport
<i>XPO1</i>	15-18	NM_003400	Transport / cycle cellulaire
<i>NOTCH1</i>	26-27-34	NM_017617	Voie NOTCH
<i>NOTCH2</i>	26-27-34	NM_024408	Voie NOTCH

Vingt-et-un gènes ont été sélectionnés d'après leurs fréquences, leur impact dans la physiopathologie des hémopathies et leur intérêt dans le diagnostic différentiel avec les entités frontières (SMZL, SDRPL). RefSeq (NCBI) correspond à l'annotation de la séquence du gène dans la base de données RefSeq (NCBI : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>).

Abréviations : SNV : *small nucléotide variant*, MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*, HCL-c leucémie à tricholeucocytes dans sa forme classique, HCL-v leucémie à tricholeucocytes dans sa forme variante, nd : données non disponibles, TLR : *Toll like receptor*, WES : *Whole Exome Sequencing*.

Gènes de la voie MAPK (Figure 12) :

La voie MAPK est la voie centrale dérégulée dans l'HCL. La mutation récurrente p.V600E et les mutations alternatives de l'exon 11 de *BRAF* provoquent la l'activation constitutive de la voie MAPK. MEK1 codé par le gène *MAP2K1*, est l'effecteur direct de *BRAF*, les mutations décrites dans ce gène sont localisées dans des régions de régulation négative, conduisant à une augmentation de l'activité enzymatique [58]. La

fonction de ERK7/8 (*MAPK15*) est mal définie, celle-ci induirait l'autophagie dans des conditions de privation de nutriments et stabiliserait c-JUN dans les cellules cancéreuses conduisant à la prolifération et la survie cellulaire [113]. *DUSP2* code une protéine inactivatrice de ERK1/2.

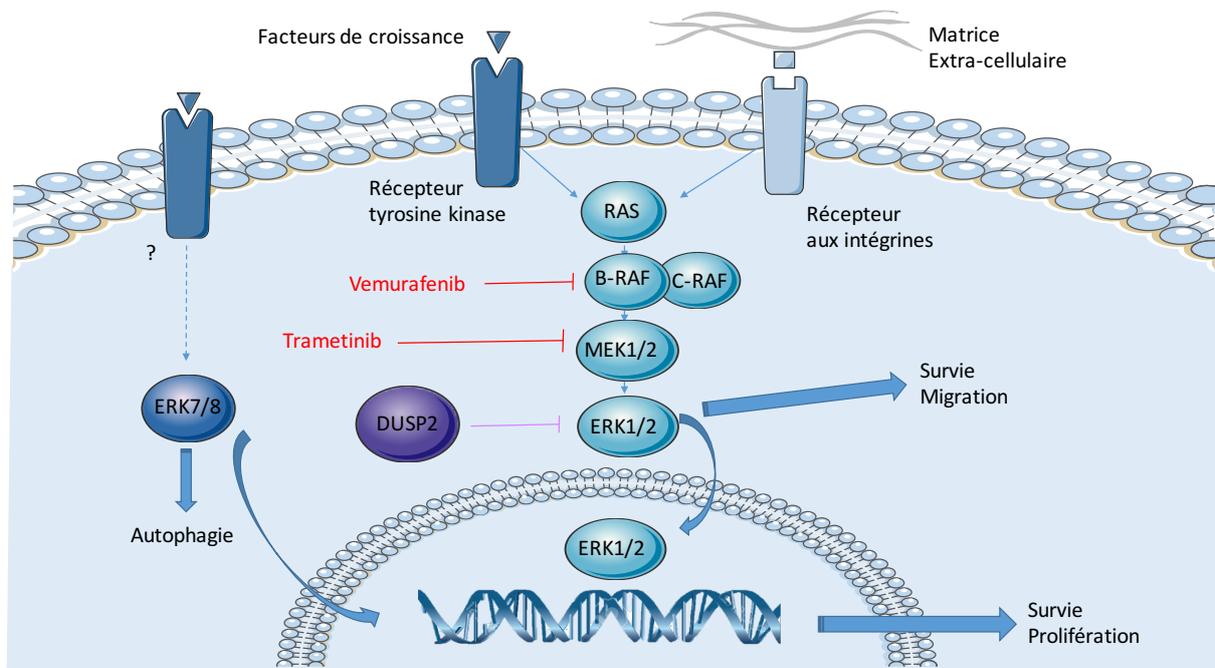


Figure 12 | Voie MAPK ciblée par le Trichopanel.

En rouge sont représentés des agents thérapeutiques. Réalisé d'après [32].

Gènes de la voie NOTCH (Figure 13) :

La voie NOTCH est fortement impliquée dans les hémopathies, principalement dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T mais également dans les lymphomes spléniques de type SMZL [100,101,114]. Les mutations activatrices de NOTCH1 et NOTCH2 sont localisées dans les domaines PEST, de trans-activation, ou d'hétérodimérisation de la protéine. L'activation de NOTCH induit la translocation de son domaine intracellulaire et la régulation de gènes impliqués dans l'homéostasie lymphoïde B et T [115].

Gènes de régulation épigénétique (Figure 13) :

La régulation épigénétique est classiquement altérée dans les cancers hématopoïétiques [32,112]. On entend par gènes régulation épigénétique, les gènes impliqués dans la modification de la conformation de l'ADN en forme active (euchromatine) ou en forme inactive (hétérochromatine). Les modifications sont de type, méthylation des îlots CpG de l'ADN ou acétylation/méthylation des histones [116]. La protéine CREBBP *via* son activité histone acétylase active des facteurs de transcription et régule notamment l'expression de *TP53*. *ARID1A*, et *ARID1B* son paralogue, codent des protéines intervenant dans les complexes de remodelage de la chromatine. La méthylation et la déméthylation des histones H3 sont régulées par deux gènes : *EZH2* codant une sous-unité catalytique d'un complexe histone méthyltransférase et *KDM6A* codant une protéine nucléaire de la famille des lysine-déméthylases.

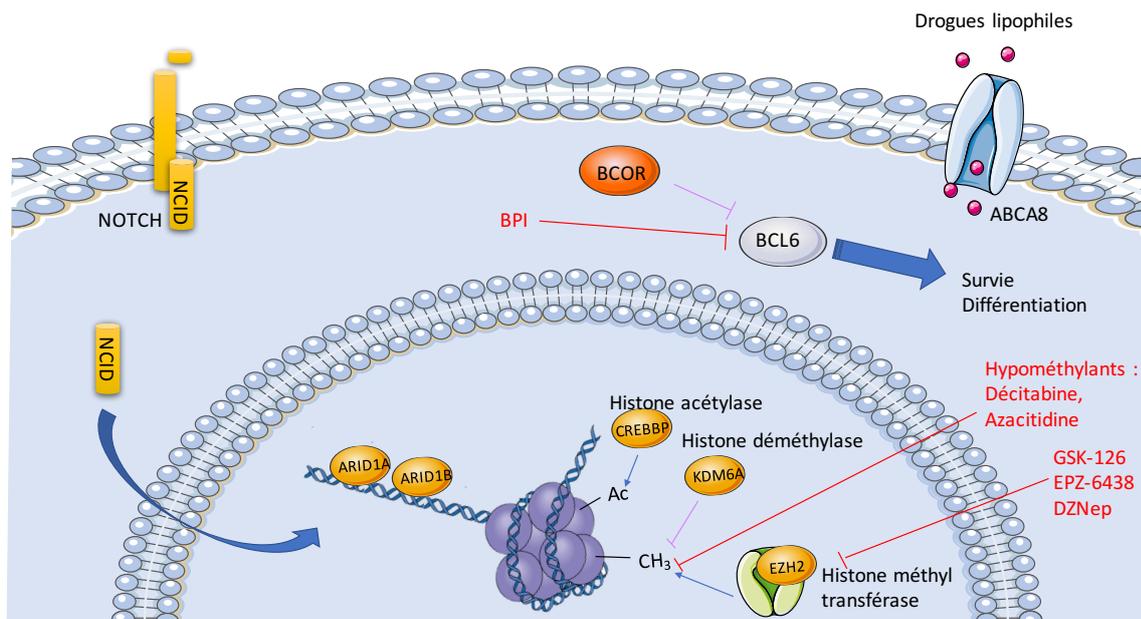


Figure 13 | Voie NOTCH et gènes de la régulation épigénétique ciblée par le Trichopanel

L'activation de NOTCH induit la translocation de son domaine intracellulaire (NCID) et la régulation de la transcription de gènes cibles. BCOR (*BCL6 corepressor*) est un inhibiteur de BCL6 (*b-cell lymphoma 6*) qui induit la différenciation des lymphocytes B. ABCA8 (*ATP binding cassette 8*) est une protéine transmembranaire de transport de drogues lipophiles. ARID1A et ARID1B (*AT rich interactive domain*) se fixent aux domaines riches en AT de l'ADN et modulent le remodelage de la chromatine. CREBBP (*CREB binding protein*), KDM6A (*Lysin demethylase 6A*) et EZH2 (*enhancer of zeste homologue 2*) interagissent directement avec les histones et régulent ainsi l'expression de gènes cibles. En rouge sont représentés des agents thérapeutiques. Réalisé d'après [32].

Gènes régulant le cycle cellulaire et l'apoptose (Figure 14) :

L'altération de la régulation du cycle cellulaire est un mécanisme central dans la survie des cellules tumorales.

- Les mutations inactivatrices de *TP53* codant la protéine p53, sont fréquemment retrouvées dans les hémopathies lymphoïdes et sont un facteur de mauvais pronostic [32].
- *CDKN1B* code la protéine p27, protéine inhibant l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Des mutations inactivatrices de *CDKN1B* sont décrites dans plus de 10% des HCL [60,91].
- *XPO1* code une exportine permettant l'export de nombreuses protéines suppresseurs de tumeur, du noyau vers le cytosol. Des mutations de *XPO1* sont retrouvées dans le PMBL et la LLC [32,117]. L'amplification de la région 2p15-16 impliquant *XPO1*, a été récemment décrite comme la cause de résistance à de nombreuses drogues [118].

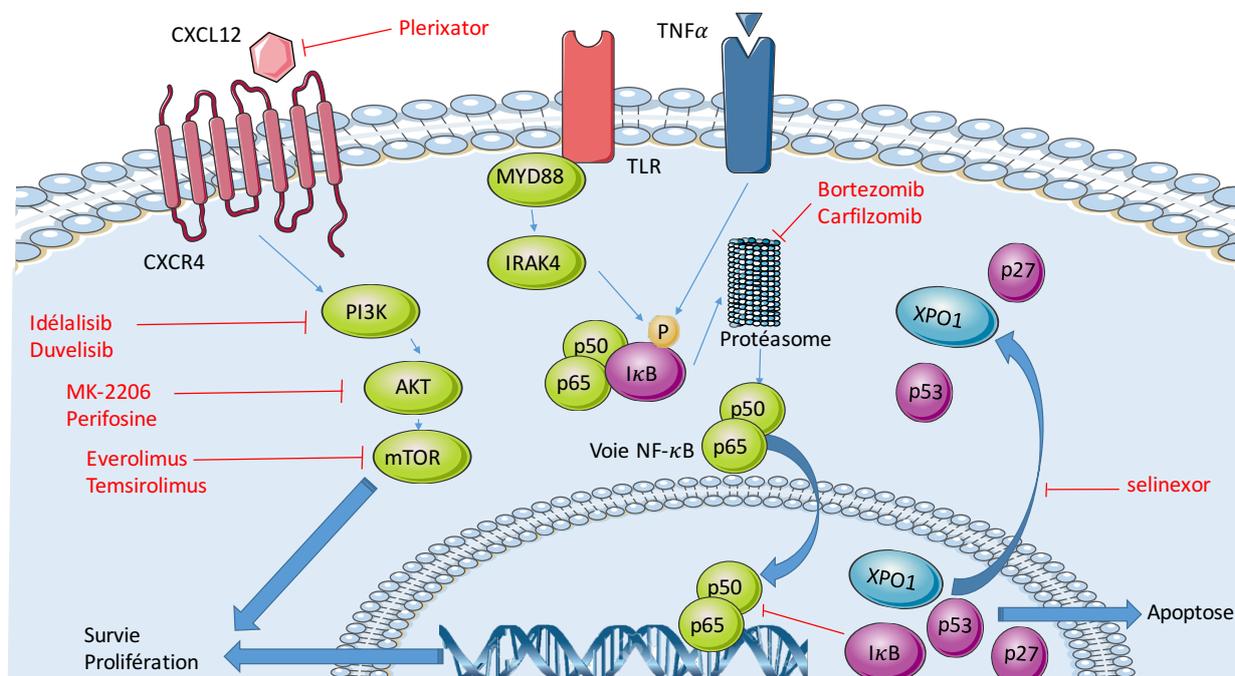


Figure 14 | Voies NF-κB et autres gènes ciblés par le Trichopanel

XPO1 est une exportine qui permet le passage cytosolique des protéines régulatrices du cycle cellulaire comme p53 et p27, mais aussi I-κB un inhibiteur de la voie NF-κB. La rétention dans le noyau de p53, p27 et IκB par le selinexor va favoriser l'entrée en apoptose et l'inhibition de la voie NF-κB. L'activation

de CXCR4 (*C-X-C motif chemokine receptor 4*) par la liaison de son ligand entraîne la cascade de signalisation PI3K-AKT-mTOR induisant la survie et la prolifération cellulaire. L'activation de MYD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) induit l'activation de la voie NF- κ B conduisant à la transcription de facteurs de survie et de prolifération. En rouge sont représentés des agents thérapeutiques. Réalisé d'après Bogusz et al [32].

Enfin le panel a été complété par les gènes suivants (Figures 13 et 14) :

- *ABCA8* code une protéine transmembranaire ayant un rôle dans le transport des drogues lipophiles [119].
- *U2AF1* code une protéine du complexe U2AF, ayant un rôle dans l'épissage des ARN. La mutation NM_001025203:c.101C>T,p.S34F est fréquemment retrouvée dans les cancers (bases de données cBioPortal <http://www.cbioportal.org>, et COSMIC <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).
- *MYD88* est un gène incontournable dans les hémopathies lymphoïdes, la mutation récurrente NM_002468:c.794T>C,p.L265P est décrite dans plus de 90% des maladies de Waldenström et plus rarement dans les SMZL et SDRPL [32,55,103].
- *CXCR4* code un récepteur membranaire aux chimiokines. Son ligand *stromal cell derived factor 1* (SDF-1=CXCL12) est sécrété par les cellules stromales et permet la migration des cellules hématopoïétiques dans la moelle. Des mutations non-sens sont fréquemment décrites dans la maladie de Waldenström [32].
- *ANXA1* est un gène codant l'annexine A1, protéine surexprimée dans l'HCL-c. Cette surexpression est recherchée en immunohistochimie et aide au diagnostic différentiel avec les proliférations frontières (Tableau 1) [55].
- *BCOR* code pour une protéine inhibitrice de BCL6 (*B-cell lymphoma 6*), induisant la différenciation des lymphocytes B. Des mutations ont été décrites dans la LLC et le SDRPL [32,63]

5-3. Choix de la zone à séquencer

Le choix de la taille et de la zone à séquencer pour chaque gène dépendait du type de mutations et de leurs localisations, nous avons choisis de cibler :

- le domaine tyrosine kinase (TK) et la zone catalytique du gène *BRAF* (exons 11 et 15) [79,83],
- les domaines d'hétéro-dimérisation (HD), de trans-activation (TAD) et le domaine PEST des gènes *NOTCH1* et *NOTCH2* (exons 26, 27 et 34),
- les domaines en doigt de zinc du gène *U2AF1* (exons 2 et 6),
- le domaine *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR) du gène *MYD88* (exons 3 à 5),
- les exons 2-11 de *TP53* pour suivre les recommandations European Research Initiative on CLL
(http://www.ericll.org/pages/projects/recommendations_p53_analysis_pospisilova)
- les domaines HEAT répétés en tandem (11 à 15) contenant le sillon hydrophobe responsable de la liaison au signal d'export nucléaire (NES) du gène *XPO1* (exons 15 à 18) [117].
- Les domaines de régulation de *MAP2K1* (exons 2 et 3)

Si les mutations étaient dispersées au sein du gène, nous avons choisi de séquencer tous les exons codants du gène (*ABCA8*, *ANXA1*, *ARID1A*, *ARID1B*, *BCOR*, *CDKN1B*, *CREBBP*, *CXCR4*, *DUSP2*, *EZH2*, *KDM6A*, *KLF2*, *MAPK15*, *MAP2K1*).

Matériel et Méthode

1. Cohorte de patients et recueil des données clinico-biologiques :

Nous avons étudié 3 lignées cellulaires (BONNA-12, JOK-1 et JVM3), obtenues de la banque cellulaire *German Collection of Microorganisms and Cell Culture* (DSMZ, Braunschweig, Allemagne) ou offerte par l'hôpital de Toulouse pour JVM-3. Vingt-cinq échantillons au diagnostic ont été analysés : 21 provenaient de patients atteints d'HCL-c et 4 de patients atteints d'HCL-v. Pour deux patients HCL-c (UPN-6 et UPN-40) et trois patients HCL-v (UPN-v1, UPN-v2 et UPN-v3) un second prélèvement à la rechute a été analysé. Les cellules mononucléées étaient obtenues de prélèvements congelés issus de sang périphérique (17 prélèvements), moelle osseuse (11 prélèvements) et biopsies (2 prélèvements : une biopsie de rate et un nodule cutané). Le diagnostic d'HCL-c a été posé sur la combinaison de données cliniques, cytologiques, immunophénotypiques et moléculaires, selon les critères de la classification OMS 2016. L'HCL-v a été diagnostiqué sur des critères cliniques, la présence de tricholeucocytes circulants présentant de manière constante un nucléole, l'absence de *BRAF*^{V600E} et un score immunophénotypique HCL ≤ 3 . Un consentement éclairé a été obtenu des patients, selon la procédure établie au CHU de Caen.

Le recueil des données cliniques des patients a été réalisé sur le logiciel Meva® (Maincare Soution) et celui des données biologiques, sur le logiciel TDNexLab® (TechniDATA).

2. Séquençage à haut débit (NGS) :

Principe : le séquençage à haut débit ciblé permet de séquencer simultanément un panel de gènes. La méthode de séquençage utilisée pour ce projet est basée sur la technologie Ion Torrent™ : l'incorporation d'une base nucléotidique entraîne la libération d'un proton. La variation de pH mesurée est traduite en une information numérique (0,1) permettant d'identifier la base incorporée (Figure 15).

Pré-analytique : les ADN utilisés ont été extraits des cellules mononuclées (PBMC) collectées après Ficoll® (séparation des cellules mononuclées par gradient de densité). L'extraction a été effectuée sur l'appareil MagnaPur® de Roche. La qualité des ADN a été vérifiée par spectrophotométrie (Nanodrop 2000®, ThermoFisher Scientific). Les critères de qualité étaient les suivants : rapport densité optique $(DO)_{260}/(DO)_{280} \geq 1,8$ et $(DO)_{260}/(DO)_{230} \geq 2$. La quantité d'ADN a été mesurée par fluorométrie sur Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific). Trente nanogrammes d'ADN ont été utilisés pour l'analyse.

La préparation des librairies a été faite par PCR multiplexe selon la technologie Ampliseq™. Le *design* des amorces de PCR a été réalisé par l'outil informatique Ampliseq Designer® (<https://www.ampliseq.com/protected/startPage.action>, version 5.6.2) par Philippe Bertrand (Centre Henri Becquerel, Rouen). Le design des amorces permettait d'obtenir 712 amplicons de taille maximale 170 pb et le nombre de bases couvertes par les amplicons était de 71,02 kb.

Analytique : les librairies ont été préparées avec le kit Ion AmpliSeq™ Library (ThermoFisher Scientific) selon les recommandations du fabricant. Les régions cibles ont été amplifiées et enrichies par PCR multiplex. Les amplicons ont été partiellement digérés par une endonucléase (élimination de la séquence des amorces de PCR). Après ligation des séquences adaptatrices et des séquences spécifiques de l'échantillon (« code-barre »), la librairie a été purifiée par des étapes de capture sur billes magnétiques. La concentration des librairies a été normalisée à 100 pM avec le Kit Ion Library Equalizer™ (ThermoFisher Scientific) selon les recommandations du fabricant. Dans une dernière étape, la matrice de séquençage a été préparée par l'automate IonChef™ (kit Hi-Q View Chef™) permettant une amplification clonale dans des microréacteurs (émulsion), ainsi que l'enrichissement et le dépôt sur la puce à semi-conducteur.

La puce utilisée pour l'analyse de l'ADN des patients et des lignées était une puce Ion 316™ Chip (produisant en moyenne 320 Mb et 2-3 millions de *reads* par puce pour une longueur moyenne de 112 pb). Le séquençage à haut débit a été réalisé sur l'appareil *Personal Genome Machine*® (PGM) de Ion Torrent (ThermoFisher Scientific). La partie technique a été réalisée avec l'aide de Catherine Maingonnat (Centre Henri Becquerel, Rouen).

Post-analytique : l'analyse primaire et secondaire des données a été réalisée par les outils bioinformatiques fournis avec le séquenceur (Torrent Suite™) : exploitation du signal, rapport de séquençage et contrôle de qualité, alignement des lectures à la séquence de référence (génome humain version GRCh37/hg19), recherche de variants et d'insertion ou délétions (indels). La qualité des échantillons a été appréciée par différents marqueurs :

- un taux de réacteurs polyclonaux < 30%,
- un score de qualité basé sur le nombre de bases satisfaisant les trois critères suivants par rapport au nombre de bases totales de l'analyse :
 - o une qualité par base ayant au moins un score Q20. Le score Q correspond à la formule : $Q = -10 \log(P)$. Pour une probabilité d'erreur à 0,01, le score Q est égal à 20,
 - o une qualité d'alignement ayant au moins un score Q20,
 - o une profondeur minimum de 20X. Cela signifie que la position a été séquencée 20 fois.

L'analyse tertiaire (annotation des variants) a été réalisée par l'outil bioinformatique Generate Reports, développé au sein de l'Unité (INSERM U1245). Cet outil permet en particulier d'importer automatiquement :

- les données de la base Annovar,
- les bases de données de polymorphismes :
 - o 1000 génomes (https://www.google.fr/?gws_rd=ssl#q=1000+genomes),
 - o ExAc (<http://exac.broadinstitute.org>)
 - o ESP (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>)
- et de prédire *in silico* les effets fonctionnels des variants à l'aide des outils
 - o Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>)
 - o CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>)
 - o SIFT (<http://sift.jcvi.org>).

A Préparation de la librairie **B** Préparation de la matrice de séquençage **C** Séquençage **D** Traitement du signal **E** Analyse des données

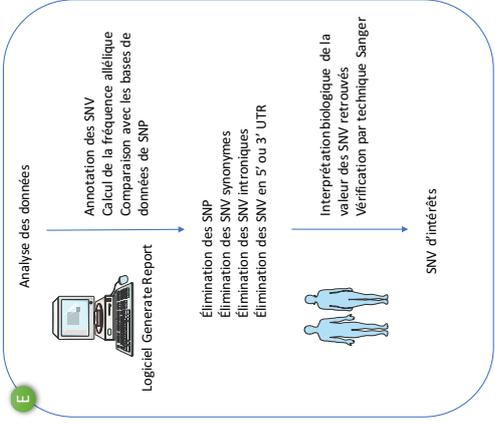
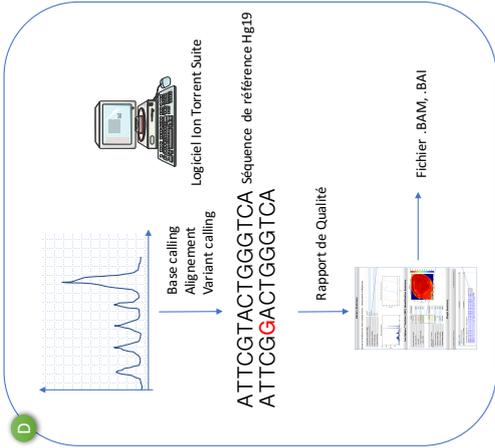
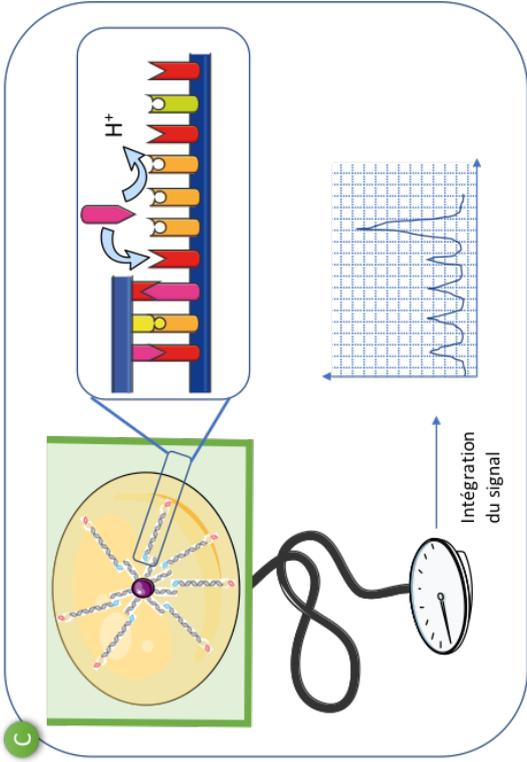
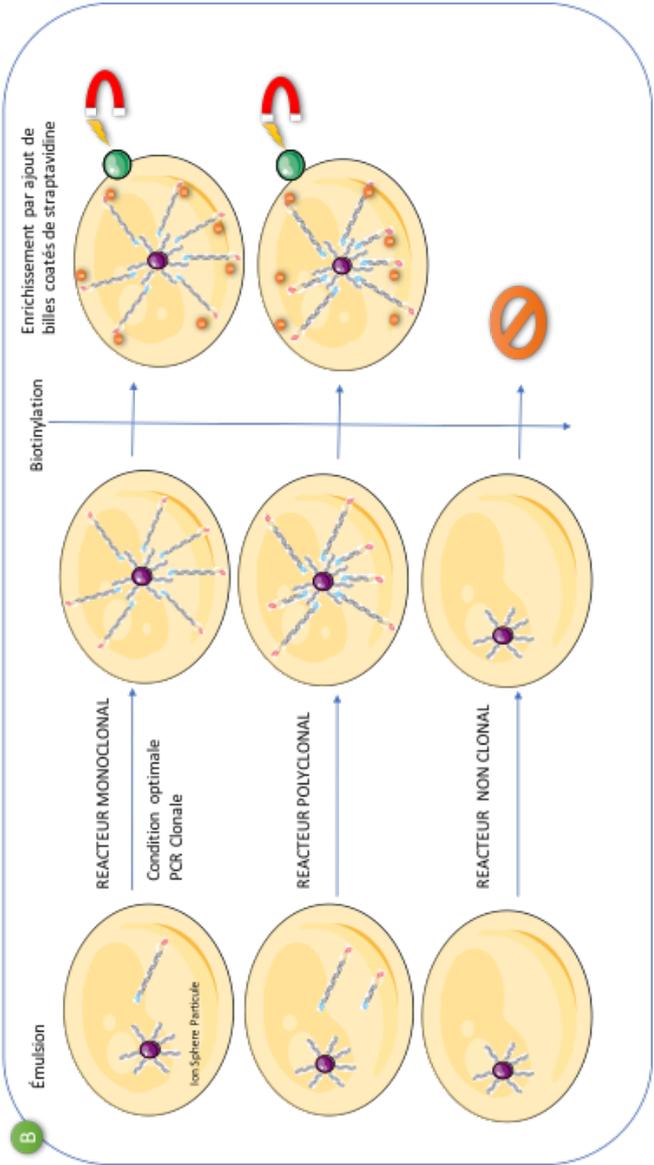
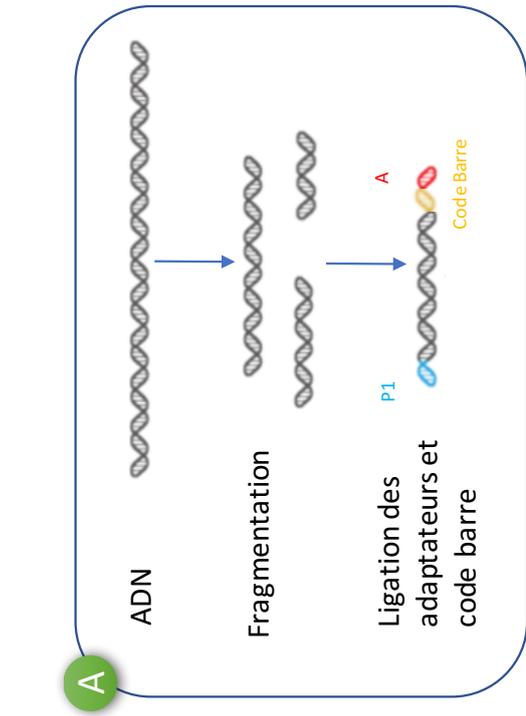


Figure 15 | Etapes analytiques du séquençage à haute débit par la technologie Ion Torrent® (ThermoFisher Scientific).

La sélection de SNV d'intérêts a été réalisée selon le schéma suivant avec la filtration :

- des variants de mauvaise qualité,
- des variants considérés comme des polymorphismes (SNP) s'ils avaient une fréquence allélique > 1% dans la population générale,
- des variations synonymes,
- des variants introniques,
- des variants situés dans les régions non traduites.

Le ratio de fréquence allélique est calculé en fonction de l'infiltration tumorale définie par CMF : $rVAF = \frac{VAF (\%)}{\text{Infiltration tumorale} (\%)}$.

Une analyse de la variation du nombre de copies (CNV) a pu être réalisée en reportant le nombre de bases séquencées sur chaque position par rapport à une ligne de base. La ligne de base a été définie à partir de la moyenne du nombre de bases obtenue sur chaque position, d'ADN extraits de PBMC de huit personnes saines séquencées sur le Trichopanel. Ce rapport et le calcul de probabilité associée ont été réalisés par l'outil bioinformatique Generate Reports. L'analyse bio-informatique a été faite avec l'aide de Pierre-Julien Viailly (INSERM U1245).

3. Séquençage selon la méthode de Sanger :

Principe : le séquençage selon Sanger repose sur la détection de l'incorporation de bases nucléotidiques fluorescentes, terminateurs de séquence, les didesoxyribonucléotides (ddNTP). Le chromatogramme obtenu, aligné sur une séquence de référence permet la détection des SNV avec une sensibilité de détection d'environ 10-20%.

Pré-analytique : les amorces de PCR ont été dessinées grâce au logiciel Primer3 (Version 4.0.0 <http://bioinfo.ut.ee/primer3>) (Tableau 4).

Tableau 4 | Liste et séquence des amorces utilisées pour le séquençage Sanger

Gène		Séquences (5'>3')
ARID1B	Forward	CACAAACTGAAAACCGTTGGC
	Reverse	CACTGTCCTTGGCGCCTC
BCOR	Forward	CTCGTAACGGGCTCTCTCAT
	Reverse	GCAAAGGACCTGTCTACCCT
ARID1A	Forward	GAACAATAACCTCACGGAGCC
	Reverse	TTGTACTGGTGGTTGGGGAA
NOTCH2	Forward	GCCACCTTTCCCTTTACAC
	Reverse	TGACATGTTCTGCCTGACCT
ABCA8	Forward	AAGGATGCAGGAAGGTGTCT
	Reverse	ACCTACTCTGTTGCATGTGA
MAP2K1	Forward	GCCAATGCCTGCCTTAGTAC
	Reverse	TCGCTGTAGAACGCACCATA
KLF2	Forward	GGGTGGTAAAAGGCAAGCAG
	Reverse	AGCAGCTCAGACACCAGG
KLF2-1	Forward	TTTCGGTGGCCCTGGTTT
	Reverse	TGCGAACTCTTGGTGTAGGT
KLF2-2	Forward	CTCGGGGTAGTAGAACGTGG
	Reverse	CGAAACCAGGGCCACCAGAAA
KLF2-3	Forward	CCTGCGTTCTATTACCCGA
	Reverse	TAGCTGCAGGTGTGAGTGG
CDKN1B	Forward	AGTTAACCCGGGACTTGGAG
	Reverse	CCAAATGCGTGTCTCAGAG
KDM6A	Forward	TTTGTGCGTGTGATCAGC
	Reverse	AGGCTGTAAGTGGACCAACA

Les extractions d'ADN et d'ARN ont été réalisées sur l'appareil MagnaPur® (Roche), l'étape de rétro-transcription a été réalisée avec des amorces oligo-dT (Invitrogen). Les amplicons obtenus après une première PCR ont été purifiés par la technique Macherey Nagel® (Machery Nagel). Une seconde PCR a été réalisée pour orienter les amplicons, le produit amplifié était ensuite purifié sur une plaque Millipore (EMD Millipore) avec du Sephadex® G-50 (GE Life Science) (Tableaux 5 et 6).

Tableau 5 | Milieux réactionnels du séquençage par la technique de Sanger

PCR amplification ADN pré-séquencage	MIX Polymérase 2X Eurogentec	*12 µL
	Amorce Forward [10 µM]	1 µL
	Amorce Reverse [10 µM]	1 µL
	ADN	1 µL
	H ₂ O	qsp 25 µL
PCR amplification ADNc pré-séquencage	MIX Polymérase 2X Eurogentec	*12,5 µL
	Amorce Forward [10 µM]	1 µL
	Amorce Reverse [10 µM]	1 µL
	ADNc	5 µL
	H ₂ O	qsp 25 µL
PCR de séquençage	Tampon Big Dye® 5X	1,5 µL
	Big Dye®	1 µL
	Amorce [10 µM]	0,5 µL
	Produit PCR amplifié	5 µL
	H ₂ O	qsp 10 µL

Abréviation : qsp : quantité suffisante pour

Tableau 6 | Protocole d'amplification par PCR

PCR amplification pré-séquencage	94°C	10 min	45 cycles
	94°C	45 secondes	
	60°C	1 min	
	72°C	1 min	
	72°C	10 min	
	10°C	infini	
PCR de séquençage	95°C	2 min	40 cycles
	96°C	10 secondes	
	50°C	5 secondes	
	60°C	2 min	
	10°C	infini	

Analytique : le séquençage a été réalisé sur le séquenceur capillaire ABI Prism3100 (ThermoFisher Scientific).

Post-analytique : l'analyse a été réalisée par le logiciel Chromas® version 2.4 (Technelysium)

4. Analyses statistiques :

Les représentations statistiques du test de Kaplan-Meier sur la durée sans traitement (TFS), la survie sans progression (PFS) et la survie globale (OS) ont été

réalisées sur le logiciel GraphPad Prism® version 7 et les *p-values* ont été calculées avec le Log-rank test. La TFS a été calculée à partir de la date du diagnostic jusqu'à la date du premier traitement (ou du dernier jour de suivi). L'OS a été calculée à partir de la date du diagnostic jusqu'à la date du décès (ou du dernier jour de suivi). La PFS a été calculée à partir de la date du diagnostic jusqu'à la date de progression de la maladie, de rechute ou de décès (ou du dernier jour de suivi). Des *p-values* <0,05 ont été considérées comme significatives.

Résultats

I. Analyse épidémiologique de la cohorte de patients :

A partir d'une cohorte de 80 patients atteints d'HCL-c ou HCL-v, 25 ont été sélectionnés selon le taux d'infiltration tumoral (>10%). L'âge médian au diagnostic de la population étudiée était de 61 ans [42-92 ans] (Tableau 7 et Annexe 1 : Tableau S1). La médiane de suivi des patients était de 31,44 mois [0-218,5 mois]. Une neutropénie a été retrouvée dans 82,3% (14/17) des cas d'HCL-c et dans aucun cas d'HCL-v, une monocytopénie dans 87,5% (14/16) des cas d'HCL-c et aucun cas d'HCL-v. Les patients ont été traités dans 82,8% (18/22) des cas avec une médiane de durée sans traitement (TFS) de 1,7 mois [0-30 mois].

Parmi les patients atteints d'HCL-c, 88,9% (16/18) ont été traités, avec en première ligne de la cladribine (n=13), de l'interféron α (n=2) ou de la pentostatine (n=1). Parmi les patients traités, 37,5% (6/16) ont rechuté avec une médiane de 25 mois [0-166,5]. Les deux patients non traités étaient d'une part un patient n'ayant pas de critère de traitement (UPN-19 : 38,5 mois de suivi) et d'autre part un patient décédé d'un sepsis le jour du diagnostic (UPN-17).

Parmi les patients atteints d'HCL-v, deux (UPN-v1 et UPN-v2), ont été traités par rituximab plus cladribine ou cladribine seule respectivement. Ils ont rechuté rapidement à 4,1 et 26 mois respectivement. Les patients UPN-v3 et UPN-v4 n'ont pas été traités à cause d'une prise en charge palliative dans un cas et l'absence de critères de traitement dans l'autre cas (suivi de 8,5 mois).

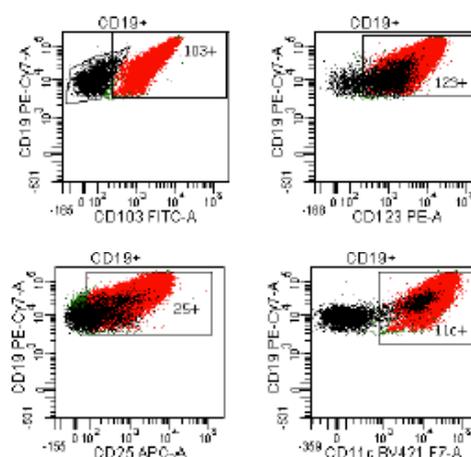
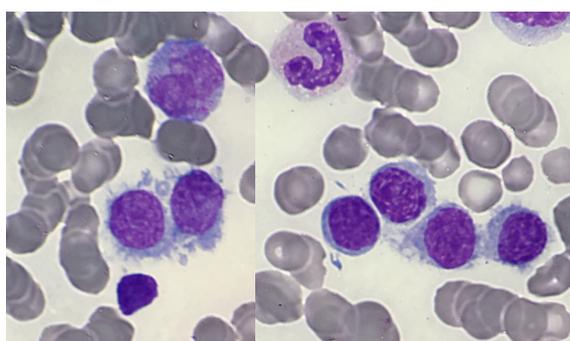
Tableau 7 | Analyse épidémiologique de la cohorte de patients étudiée en NGS

	HCL-c (n=21)	HCL-v (n=4)	TOTAL (n=25)
Age au diagnostic (années) (Médiane [min-max])	55 [42-92]	69,5 [64-82]	61 [42-92]
Ratio Femme/Homme	5/21	0/4	5/25
Durée de suivi (mois) (Médiane [min-max])	38,52 [0-218,5]	19,9 [8,9-31,4]	31,44 [0-218,5]
Neutropénie (% ,n)	82,3% (14/17)	0% (0/4)	66,7% (14/21)
Monocytopénie (% ,n)	87,5% (14/16)	0% (0/4)	70% (14/20)
Anémie (% ,n)	47% (8/17)	75% (3/4)	52,4% (11/21)
Traitement (% ,n)	88,9% (16/18)	50% (2/4)	82,8% (18/22)
TFS (mois) (Médiane [min-max])	1,67 [0-30]	2,57 [2-3,15]	1,70 [0-30]
rechutes (% ,n)	37,5% (6/16)	50% (2/4)	40,0% (8/20)
PFS (mois) (Médiane [min-max])	25,02 [0-166,5]	15,07 [4,13-26]	25,05 [0-166,5]

Définitions : Neutropénie : valeur absolue de Polynucléaires neutrophiles (PNN)<1,5 G/L;
 Monocytopénie : valeur absolue de monocytes <0,20 G/L; Anémie : taux d'hémoglobine <120 g/L
 pour les femmes et <130 g/L pour les hommes
 Abréviations : PFS : Durée avant progression, TFS: Durée avant traitement

L'analyse de l'immunophénotypage lymphocytaire au diagnostic (Annexe 1 : Tableau S1) retrouvait un score HCL ≥ 3 dans 100% (21/21) des cas d'HCL-c et un score ≤ 2 dans 75% (3/4) des cas d'HCL-v. Le patient UPN-40 a été diagnostiqué et maintenu en leucémie à tricholeucocytes de forme classique sur l'aspect cytologique et le score phénotypique malgré l'absence de la mutation $BRAF^{V600E}$ (Figure 16). Ce patient a évolué de manière défavorable avec de multiples rechutes. Le patient UPN-v3 avait un score HCL à 3 il a cependant été classé comme forme variante sur les arguments suivants : absence la mutation $BRAF^{V600E}$ et la présence constante d'un nucléole. Ce patient diagnostiqué à 82 ans présentait une altération sévère de son état général, empêchant la mise en place de thérapies. Le patient a été perdu de vue (Figure 16).

UPN-40



UPN-v3

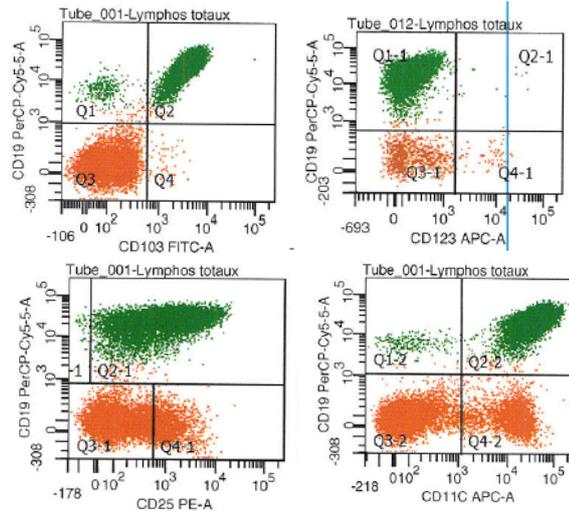
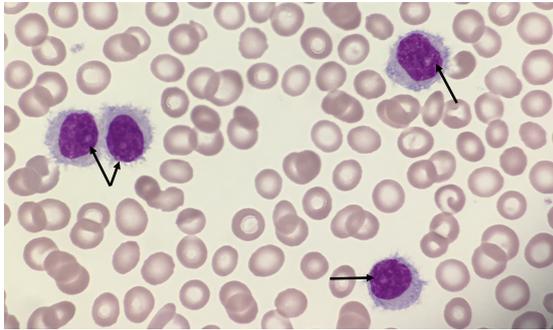


Figure 16 | Analyse cytologique et immunophénotypique des patients atypiques

UPN-40 : tricholeucocytes, absence de nucléoles (MGG, Moelle, x1000). Score HCL : 4/4 ; tricholeucocytes : population rouge (FACS CANTO II Becton Dickinson). UPN-v3 : présence constante d'un nucléole proéminent (flèches) (MGG, sang, x1000). Score HCL =3. Le CD123 n'a pas été réalisé sur le même prélèvement ; tricholeucocytes, population verte (FACSCALIBUR, Becton Dickinson)

L'expression du CD10 est rare, décrit dans 10-20% dans la littérature [76]. Au sein du laboratoire d'hématologie du CHU de Caen, il a été retrouvé dans 6,25% des cas (5/80) et dans notre série de 25 patients, 3 avait une HCL-c CD10+.

II. Analyse moléculaire de la cohorte :

1. Données globales de l'analyse NGS des patients au diagnostic

L'interprétation du Trichopanel a été possible pour 96% (24/25) patients et a été pertinent pour 96% des patients (23/24) (aucun SNV n'a été retrouvé pour le patient UPN-10 sur les 21 gènes analysés). Le séquençage de la librairie a atteint une profondeur médiane globale par échantillon de 322X [89X-533X] avec 97,25% des bases ciblées couvertes par plus de 20 reads (annexe 2 Tableau S2). 891 variants

totaux ont été détectés (médiane par échantillon 37,5 [6-57]), puis filtrés sur la qualité, le caractère polymorphique et l'intérêt fonctionnel. Cette première filtration a abouti à la sélection de 51 variants d'intérêt.

La confirmation des mutations par l'utilisation du séquençage par la méthode Sanger a été requise pour 13 SNV. Cette confirmation était nécessaire lorsque les variants étaient décrits pour la première fois et que le score de qualité ne permettait pas de les valider d'emblé. Le séquençage par méthode Sanger a confirmé 5 SNV (Figure 17). Quatre SNV avec des VAF<7% n'ont pu être détectés par cette méthode du fait d'une sensibilité inférieure à 10%. Les quatre séquençages de mutations dans le gène *KLF2* ont été un échec. Ces échecs étaient liés à des difficultés à amplifier une zone contenant de nombreuses répétitions, ces variants n'ont donc pas été pris en compte dans l'analyse finale.

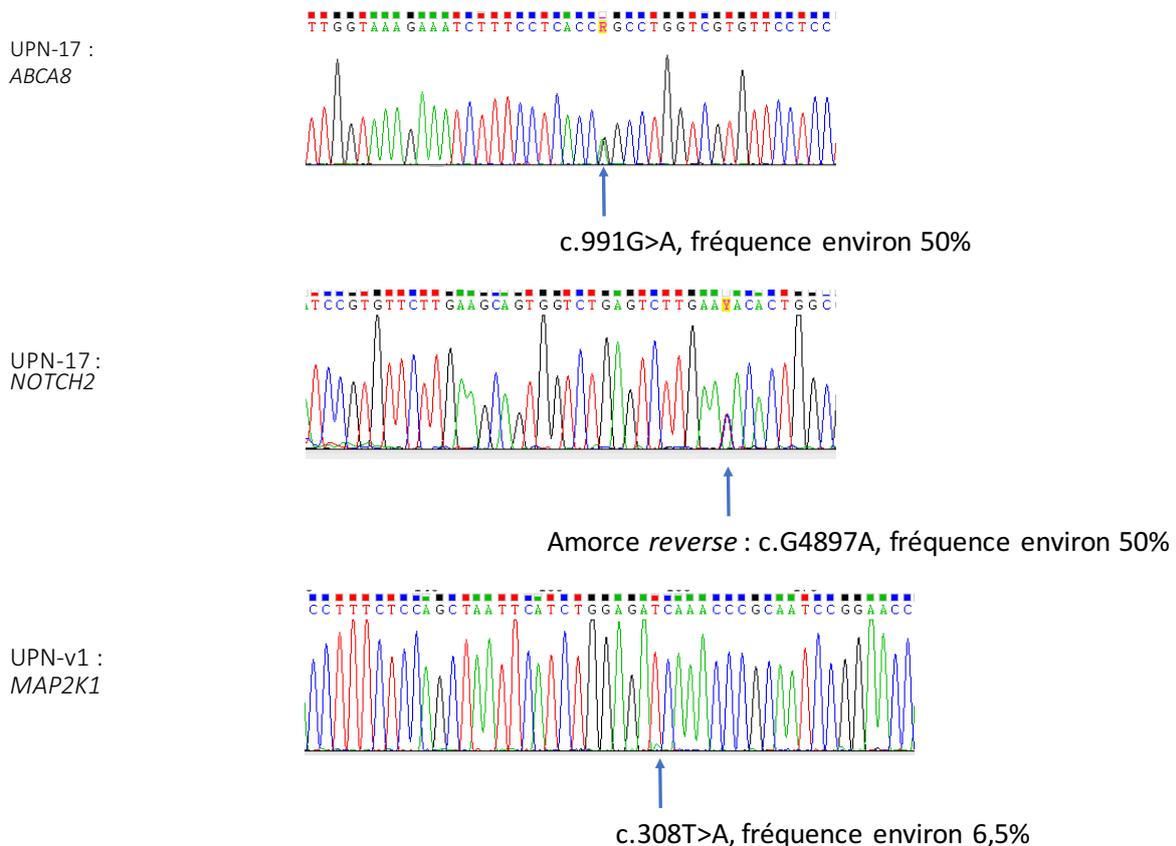


Figure 17 | Exemples de chromatogrammes de 3 SNV validés par la méthode Sanger

Les flèches localisent la position du SNV, la fréquence est estimée à partir de la hauteur de pics (Chromas v2).

Une analyse supplémentaire au cas par cas, a permis d'éliminer des SNP de faibles fréquences (décrits dans moins de 1% de la population générale). Il fallait pour cela :

- que le variant soit répertorié dans la base de données ExAC,
- que la fréquence allélique du SNV soit proche de 50%
- et que les outils de prédiction *in silico* orientent vers une variation bénigne (Polyphen, CADD, SIFT).

Un total de 35 variants a finalement été retenu pour la cohorte de patients (Figure 18) soit une amplitude de 0 à 3 SNV d'intérêts par patients.

Les gènes les plus touchés étaient *BRAF* (n=18), *KLF2* (n=4), *MAP2K1* (n=3), *KDM6A* (n=2), *CDKN1B* (n=2), *ARID1A* (n=2), *CREBBP* (n=2), *NOTCH1* (n=1) et *ARID1B* (n=1) (Figure 18 et Tableau en annexe S3).

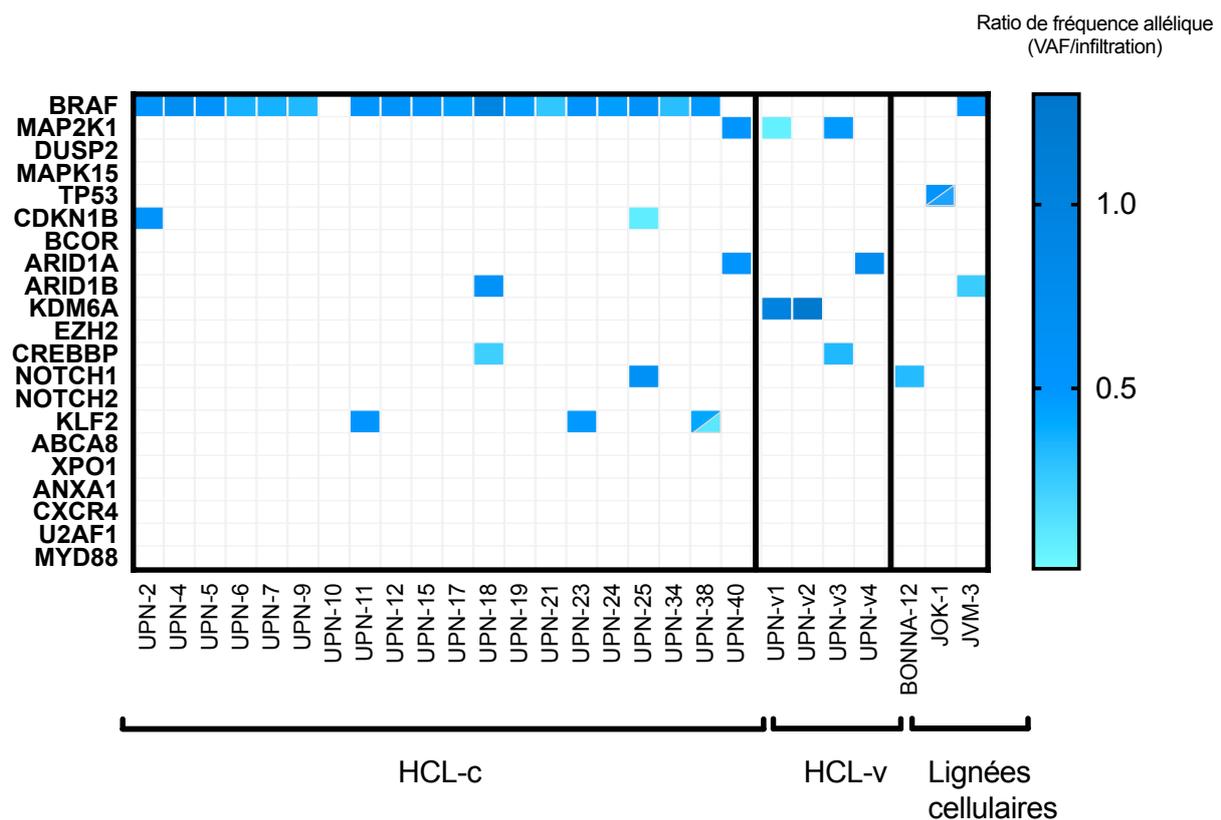


Figure 18 | Représentation en *Heat-Map* des mutations d'intérêts dans la cohorte de patients et les 3 lignées cellulaires

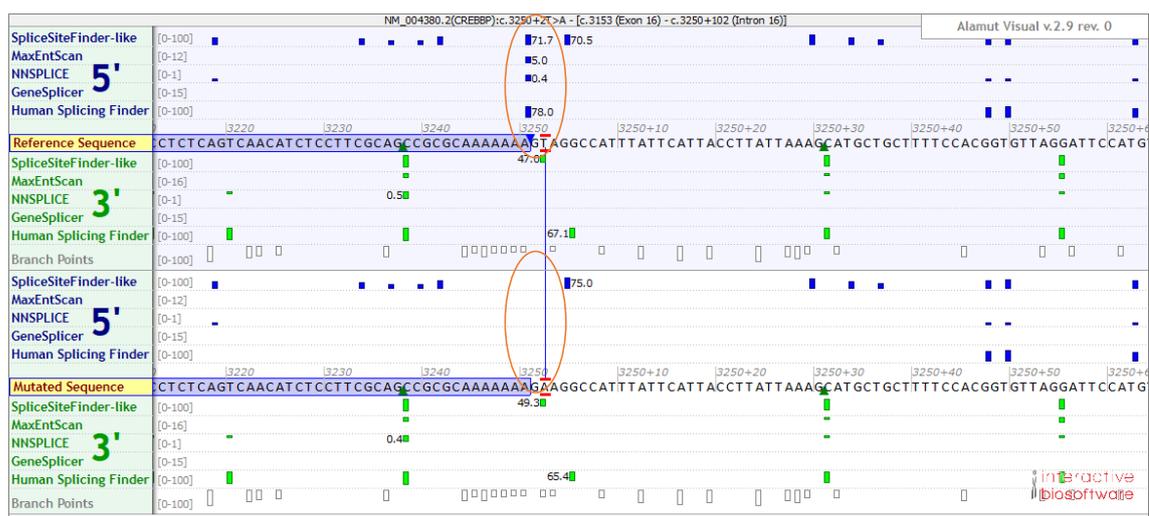
Chaque colonne représente un patient et chaque ligne un gène du Trichopanel. L'intensité de la couleur bleue est proportionnelle au ratio de fréquence allélique (rVAF) avec en bleu foncé un rVAF proche de 1 et en bleu clair une valeur de rVAF <0,3.

Trois SNV étaient situés dans des sites conservés de l'épissage et ont pu être analysés grâce à l'algorithme (Alamut®, interactive Biosoftware) mis au point dans le groupe du Dr Alexandra Martins (INSERM U1245) (Figure 19) :

- *CREBBP* (NM_004380:intron16-17:c.3251+2T>A) ce variant dans le site donneur d'épissage provoquerait un défaut majeur d'épissage de l'intron 16-17 et un décalage du cadre de lecture
- *KLF2* (NM_016270:intron1-2:c.76-1G>A), ce variant sur le site accepteur d'épissage est prédit comme fortement délétère et a déjà été décrit dans plusieurs SMZL [99,120]
- *KDM6A* (NM_021140:intron23:c.3434-1G>A), ce variant sur le site accepteur d'épissage est prédit comme possiblement délétère et n'a à ce jour jamais été décrit.

La répercussion des variations d'épissage de *CREBBP* et *KLF2* n'a pas pu être complétée par des études sur l'ARN faute de matériel disponible.

A Chr16(GRCh37):g.3817719A>T, NM_004380.2(CREBBP):c.3250+2T>A (Intron 16)



B

Chr19(GRCh37):g.16436026G>A, NM_016270.3(KLF2):c.76-1G>A (Intron 1)



C

ChrX(GRCh37):g.44945109G>A, NM_021140.2(KDM6A):c.3434-1G>A (Intron 23)

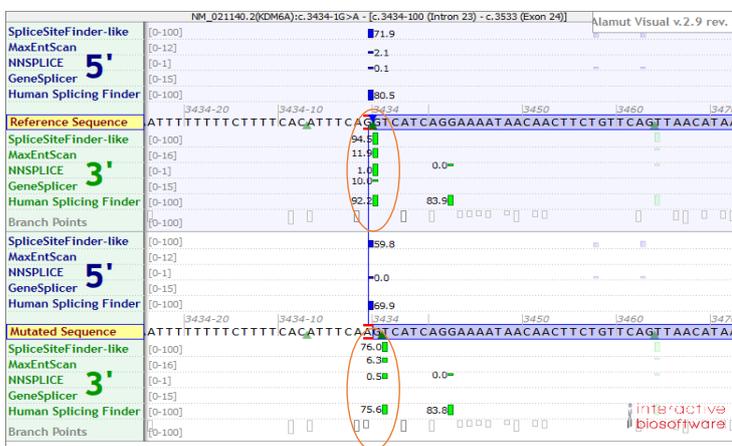


Figure 19 | Représentation de la prédiction du saut d'exon sur le logiciel Alamut®

(A) La prédiction *in silico* de la variation c.3250+2T>A en 5' du site d'épissage de l'intron 16 de *CREBBP* induirait un saut de l'exon 16 (=190 nt) entraînant un décalage du cadre de lecture. (B) La prédiction *in silico* de la variation c.76-1G>A en 3' du site d'épissage de l'intron 1 de *KLF2* induirait un saut de l'exon 2 (=817 nt) entraînant un décalage du cadre de lecture. (C) La prédiction *in silico* de la variation c.3434-1G>A en 3' du site d'épissage de l'intron 23 de *KDM6A* induirait un défaut probable de l'épissage de l'exon 24 (=115 nt) entraînant un décalage du cadre de lecture avec une probabilité d'environ 20%. Les scores de puissance du site d'épissage, selon chaque algorithme, sont entourés en orange. D'après Alamut® Visual 2.9 (Integrative Biosoftware)

2. Résultats de NGS dans les lignées cellulaires

Le Trichopanel et l'analyse des variants ont été validés par le séquençage des 3 lignées cellulaires (BONNA-12, JOK-1 et JVM3) dont certaines mutations étaient déjà connues : *NOTCH1*^{T2466M} dans BONNA-12, *BRAF*^{K601N} dans JVM-3 [121](COSMIC Cell lines project http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines).

Ainsi conformément aux données précédemment publiées, la mutation *BRAF*^{V600E} n'a pas été retrouvée dans ces lignées mais d'autres mutations ont été mises en évidence pour la première fois : *TP53*^{Y234H} et *TP53*^{R213Q} dans JOK-1 et *ARID1B*^{P1435L} dans JVM-3 (Figure 18 et Annexe 4 table S4).

3. Résultats de la cohorte des patients HCL-c

3-1. *BRAF*

Parmi les patients atteints d'HCL-c, la mutation *BRAF*^{V600E} a été retrouvée dans 90% (18/20) des cas (Figure 20). La fréquence allélique de la mutation *BRAF*^{V600E} était compatible avec une atteinte hétérozygote avec un rVAF médian de 0,48 ± 0,12. Parmi les deux patients sans la mutation *BRAF*^{V600E} : UPN-40 avait une mutation dans *MAP2K1* (NM_002755:exon2:c.G171C-(p.K57N)) (Figure 23), le second patient, UNP-10, n'avait aucune mutation dans les gènes recherchés par le Trichopanel.

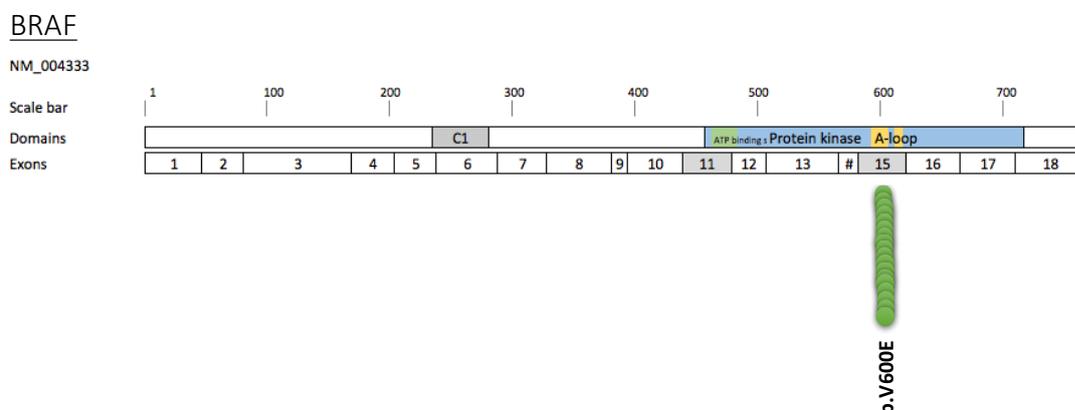


Figure 20 | Représentation des mutations de la cohorte de patients dans *BRAF*

● Variation faux-sens ; en gras : variant déjà décrit dans l'HCL [30], en gris sont représentés les exons qui ont été séquencés dans le Trichopanel. Abréviations : C1 : *C1 protéine kinase-like* domaine.

3-2. Mutations additionnelles à *BRAF*^{V600E}

Des variants additionnels à *BRAF*^{V600E} ont été retrouvés chez 33% (6/18) des patients HCL-c. Ces SNV ont été trouvés par ordre de fréquence dans *KLF2* (n=3), *CDKN1B* (n=2) et *NOTCH1* (n=1).

3-2-1. *KLF2*

Les mutations retrouvées dans *KLF2* étaient de type faux sens et variant d'épissage. Les variations faux-sens étaient localisées soit dans le domaine en doigts de Zinc (ZnF) soit adjacentes au domaine de localisation nucléaire (NLS) (Figure 21) :

- UPN-11: NM_016270:exon2:c.G824A-(p.S275N). rVAF = 0,52
- UNP-18: NM_016270:splicing variant:c.76-1G>A. rVAF = 0,18 (sous-clonale)
- UPN-23 : NM_016270:exon2:c.G824C-(p.S275T). rVAF = 0,48
- UPN-38 : NM_016270:exon2:c.C812T-(p.T271I) et NM_016270:exon2:c.C851G-(p.T284S). rVAF = 0,42 et 0,16 respectivement.

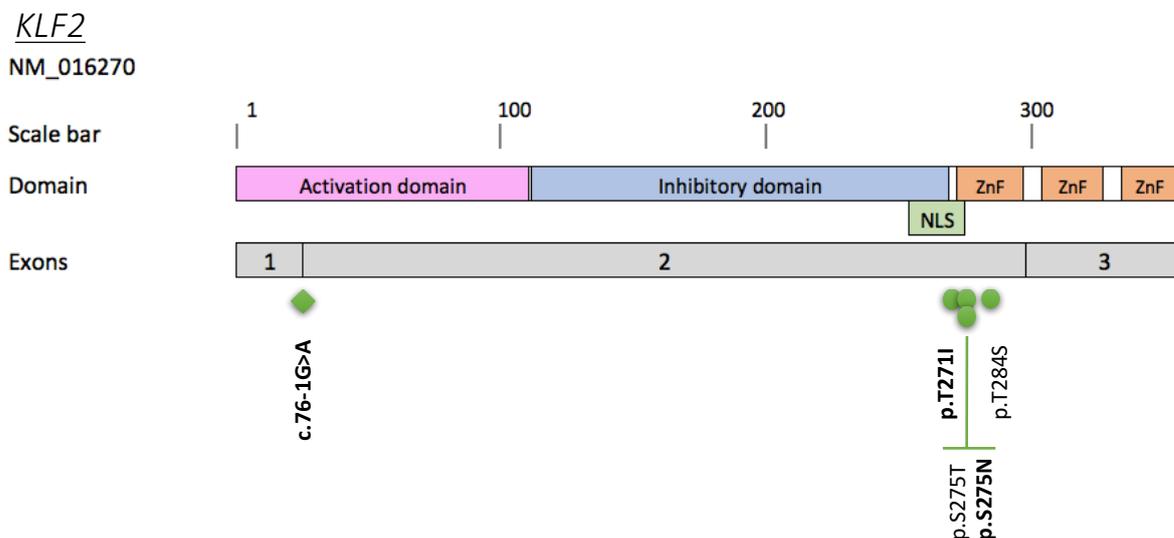


Figure 21 | Représentation des mutations de la cohorte de patients dans *KLF2*

● Variation faux-sens ; Variants d'épissage ; en gras : variant déjà décrit dans la littérature dans des SMZL [99,120] ; en gris sont représentés les exons séquencés dans le Trichopanel. Abréviations : NLS : signal de localisation nucléaire, ZnF : domaine en doigts de Zinc

3-2-2. CDKN1B

Des mutations dans CDKN1B ont été mises en évidence chez deux patients, ces mutations sont de type non-sens et *stop-loss*. Une mutation avait un rVAF compatible avec un statut hétérozygote (UPN-2 : rVAF=0,58) et la seconde était compatible avec un statut sous-clonal (UPN-25 : rVAF=0,09) (Figure 22).

CDKN1B

NM_004064

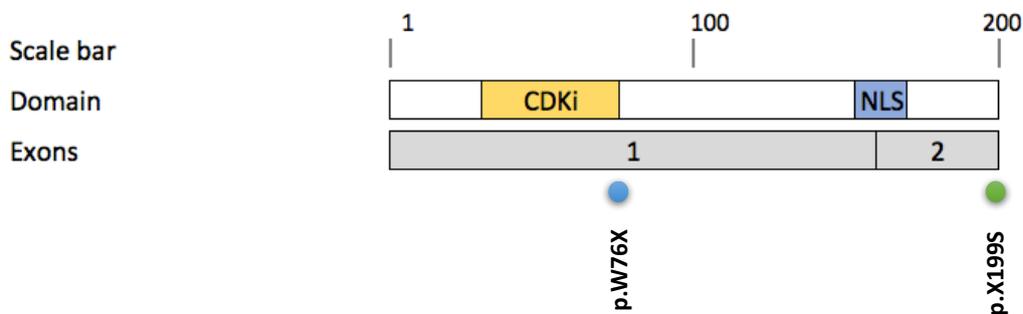


Figure 22 | Représentation des mutations de la cohorte de patients dans *CDKN1B*

● Variation faux-sens ; ● Variants non-sens; en gras : variant déjà décrit dans la littérature dans des HCL [60] ; en gris sont représentés les exons séquencés dans le Trichopanel. Abréviations : CDKi : domaine inhibiteur des cycline-dépendantes kinase, NLS : domaine de localisation nucléaire

4. Résultats de la cohorte des patients HCL-v

4-1. MAP2K1

Parmi les quatre patients HCL-v, deux étaient porteurs de SNV dans *MAP2K1* (Figure 23), ces mutations étaient déjà décrites dans la littérature [58] :

- UPN-v1 : NM_002755:exon3:c.T308A-(p.I103N). rVAF = 0,07 (sous-clonale)
- UPN-v3 : NM_002755:exon2:c.A167C-(p.Q56P). rVAF = 0,48.

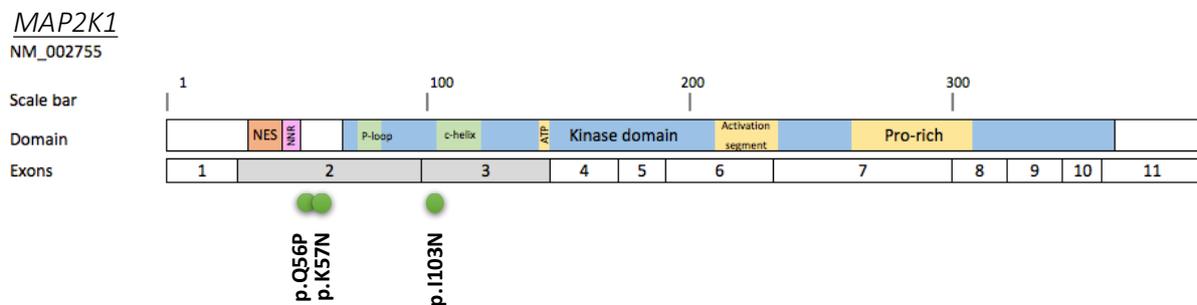


Figure 23 | Représentation des mutations de la cohorte de patients dans *MAP2K1*

● Variation faux-sens ; en gras : variant déjà décrit dans la littérature dans des HCL [58] ; en gris sont représentés les exons séquencés dans le Trichopanel. Abréviations : NES : signal d'export nucléaire, NNR : domaine de régulation négative, Pro-rich: domaine riche en proline.

4-2. Régulation épigénétique

Tous les patients atteints d'HCL-v avaient des mutations dans les gènes de la régulation épigénétique (Figure 18), incluant :

- *KDM6A* (n =2), UPN-v1 et UPN-v2
- *CREBBP* (n=1) UPN-v3
- *ARID1A* (n=1) UPN-v4

Le gène *KDM6A* a été retrouvé altéré chez deux patients. Ces SNV provoqueraient des altérations de type « perte de fonction » avec dans un cas, une délétion entraînant un décalage du cadre de lecture (NM_021140:exon12:c.1096delA-(p.N366fs)) et dans l'autre cas, une variation sur le site accepteur d'épissage (NM_021140:intron23:c.3434-1G>A) (Figure 24).

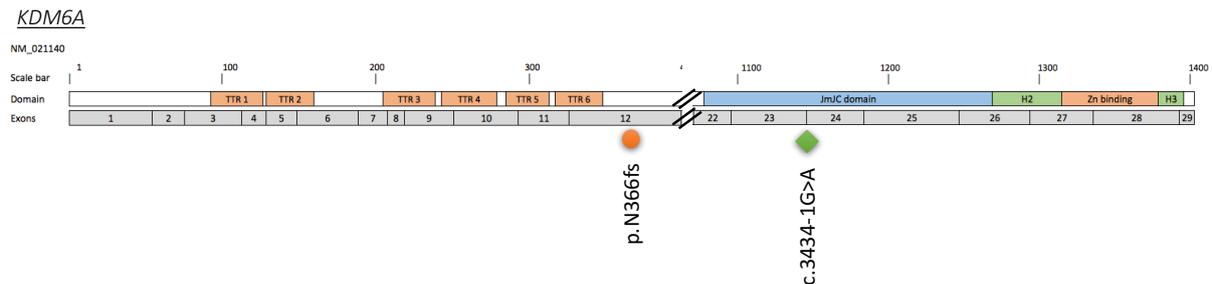


Figure 24 | Représentation des mutations de la cohorte de patients dans *KDM6A*

● Variation faux-sens ; ● Délétion ; en gris sont représentés les exons séquencés dans le Trichopanel. Abréviations : TTR : répétitions Tétratricopeptides, JmJC : domaine Jumonji, H2-H3 : domaines hélicoïdaux 2 et 3, Zn : Zinc.

L'étude de l'ARN du patient UPN-v1 par séquençage Sanger a permis de confirmer le saut complet de l'exon 24 du gène *KDM6A* (Figure 25). *KDM6A* est porté sur le chromosome X, expliquant la VAF proche de l'infiltration tumorale, lié à la perte d'hétérozygotie chez les sujets masculins (rVAF= 0,99 et 1,01 pour UPN-v1 et UPN-v2 respectivement).

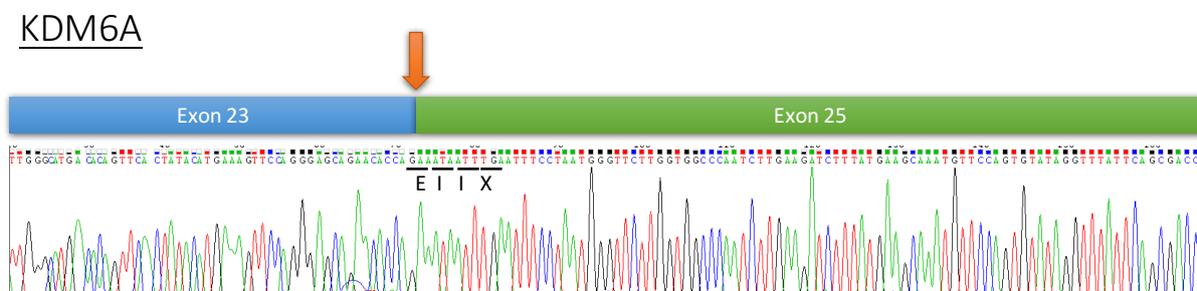


Figure 25 | Chromatogramme du séquençage de l'ARN de *KDM6A* chez UPN-v1

La flèche orange localise le saut de l'exon 24 lors de l'épissage de l'ARNm : ce saut d'exon entraîne un décalage du cadre de lecture avec l'apparition d'un codon STOP au bout de 3 codons (Séquençage Sanger).

5. Variations du nombre de copies

L'analyse de la variation du nombre de copies (CNV) a mis en évidence de nombreuses anomalies (Figure 26 et Annexe 3 : Tableau S3).

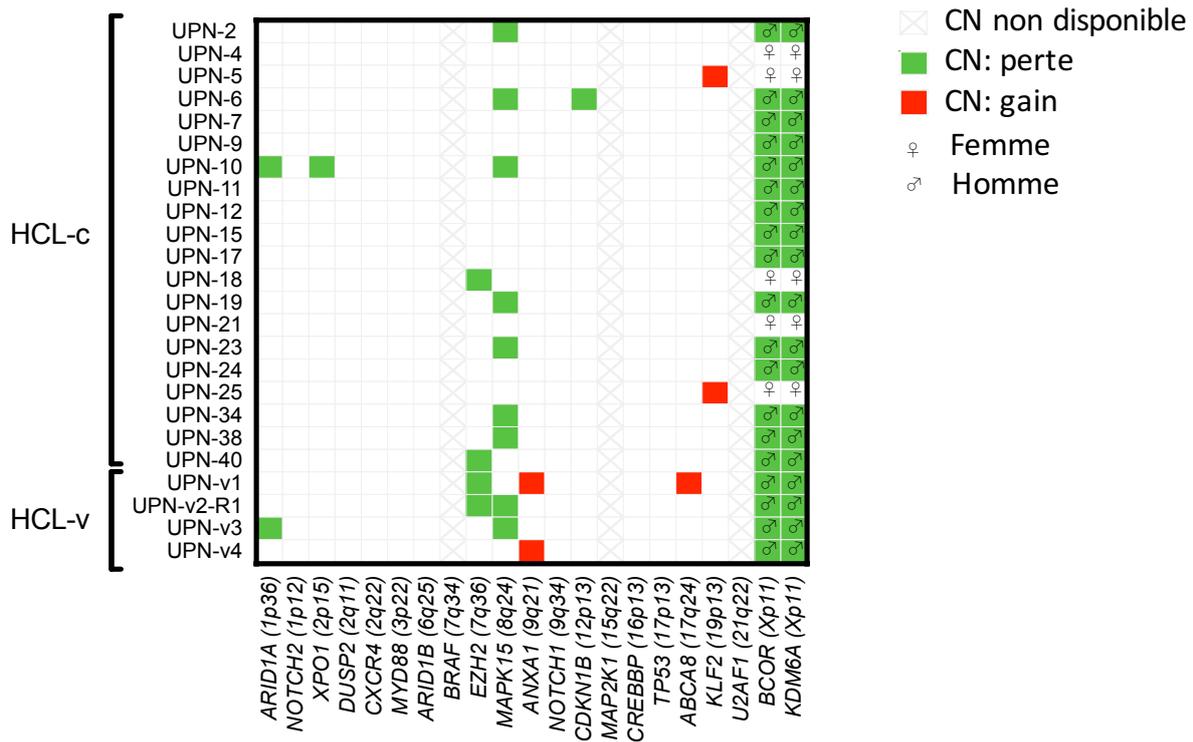


Figure 26 | Représentation des CNV chez les patients étudiés

Représentation en *Heat-map* des variations du nombre de copies (CNV) détectées chez les patients étudiés. En ordonnée : chaque ligne représente un patient. En abscisse : chaque colonne représente un gène du Trichopanel, la position chromosomique du gène est indiquée entre parenthèses. Les CNV de *BRAF*, *MAP2K1* et *U2AF1* n'ont pas été interprétables du fait d'un trop faible nombre d'amplicons couvrant le gène (<5). La délétion de *BCOR* et *KDM6A* (portés sur le chromosome X) est corrélée au sexe. Les *q-values* ont été calculées avec le *false discovery rate* -test. Abréviations : CN : nombre de copies du gène.

Le CNV le plus fréquent était la perte d'une copie de *MAPK15* dans 37,5% (9/24) des cas.

Quatre patients, tous, $BRAF^{WT}$, avaient une perte de copie d' $EZH2$ (UPN-18, UPN-40, UPN-v1 et UPN-v2). $EZH2$ est un gène situé en 7q36.1 proche de $BRAF$ (7q34). Deux patients (UPN-v1 et UPN-v2) pour lesquels un caryotype avait été réalisé, avaient un chromosome 7q anormal (une délétion et un réarrangement). Nous pouvons donc supposer que la perte d' $EZH2$ est corrélée à une région chromosomique 7q anormale et pour aller plus loin, à la perte de $BRAF$. Cette hypothèse ne peut être confirmée par l'étude de variation du nombre de copies par NGS car la région couverte dans $BRAF$ (exon 11 et exon 15) était trop faible pour faire ressortir une variation statistiquement significative. Des études de CGH-array pourraient confirmer notre hypothèse. Nous n'avons pas réalisé cette technique lors de ce projet.

6. Analyse des prélèvements issus de la rechute

Nous avons pu analyser des prélèvements sériés provenant du diagnostic et de la rechute/évolution pour 5 patients (2 HCL-c et 3 HCL-v).

Pour un patient HCL-c (UPN-6) nous observons le même profil mutationnel au diagnostic et à la rechute. Dans le second cas d'HCL-c (UPN-40), deux nouvelles mutations sous-clonales ($BCOR^{E1430X}$ and $XPO1^{E571K}$) ont été mises en évidence (Figure 27).

Parmi les trois patients atteints d'HCL-v, (deux traité et un non traité), aucune nouvelle mutation n'a été détecté, mais on retrouve une variation dans les fréquences alléliques dans deux cas. UPN-v1 avait une augmentation de la fréquence allélique de $MAP2K1^{I103N}$ (rVAF=0,07 au diagnostic et 0,41 à la rechute). UPN-v3 avait une diminution de la fréquence allélique du variant d'épissage dans $CREBBP$ (rVAF=0,34 puis 0,06) et une augmentation de la mutation $MAP2K1^{Q56P}$ (rVAF= 0,48 au diagnostic puis 0,93). Ce patient n'a pas été traité entre les deux échantillons mais a évolué défavorablement.

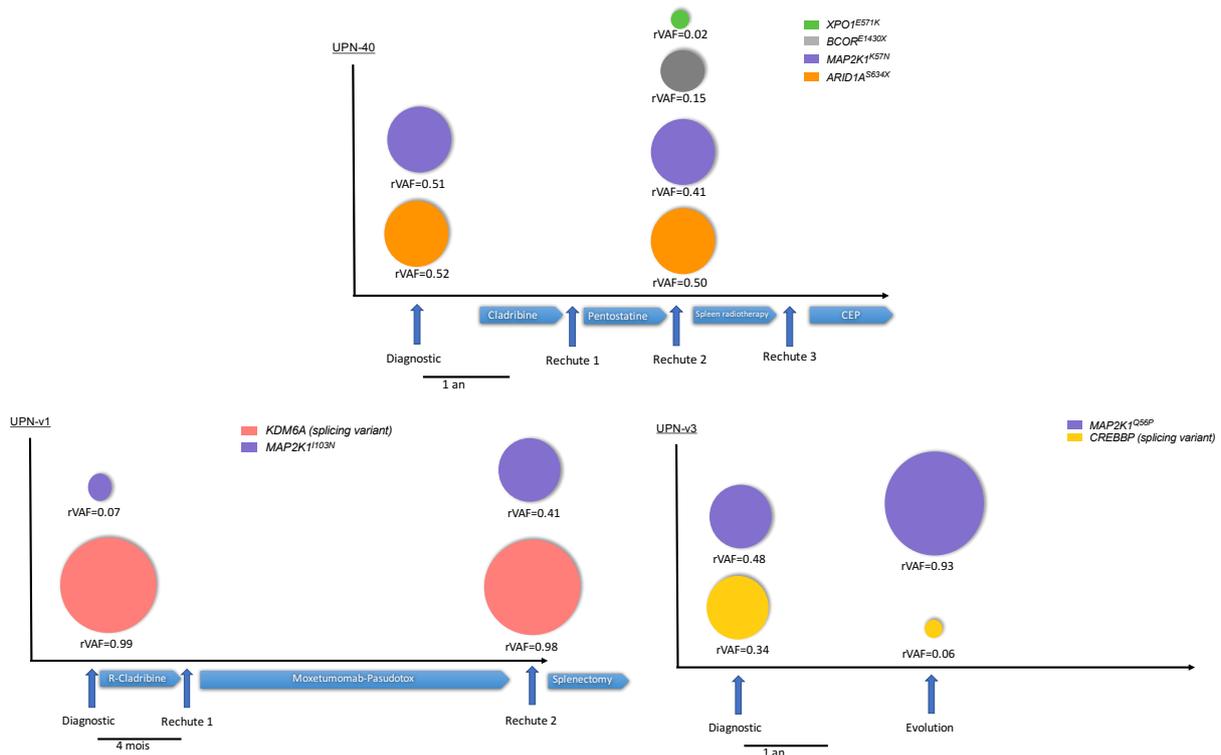


Figure 27 | Profils d'évolution clonale de la maladie lors de la rechute

Représentations des variations d'intérêts des mutations des patients HCL-c (UPN-40) et HCL-v (UPNv1 et UPN-v3) au diagnostic et à la rechute. Pour chaque patient les cercles sont proportionnels au rVAF. UPN-40 montre l'apparition de 2 nouvelles mutations sous clonales à la rechute : *BCOR*^{E1430X} et *XPO1*^{E571K}. UPN-v1 a une augmentation de la rVAF de *MAP2K1*^{I103N} à la rechute. UPN-v3 a une diminution de la rVAF du variant d'épissage de *CREBBP*, et une augmentation de *MAP2K1*^{Q56P}. Ce patient n'a pas été traité entre les deux points analysés. Abréviations : CEP Cisplatine-Endoxan-Epirubicine, R-Cladribine: Rituximab+cladribine.

7. Répercussion clinique

Dans notre série il n'y avait pas de différence significative dans la durée avant mise sous traitement (TFS) ou survie sans progression (PFS) lorsqu'il y avait ou non des altérations additionnelles à *BRAF*. Cependant, dans la cohorte HCL-c, l'étude statistique selon le statut délété ou non de *MAPK15*, a montré un allongement significatif de la PFS en cas de délétion (Figure 28). Nous n'avons pas retrouvé cette différence sur l'OS et la TFS.

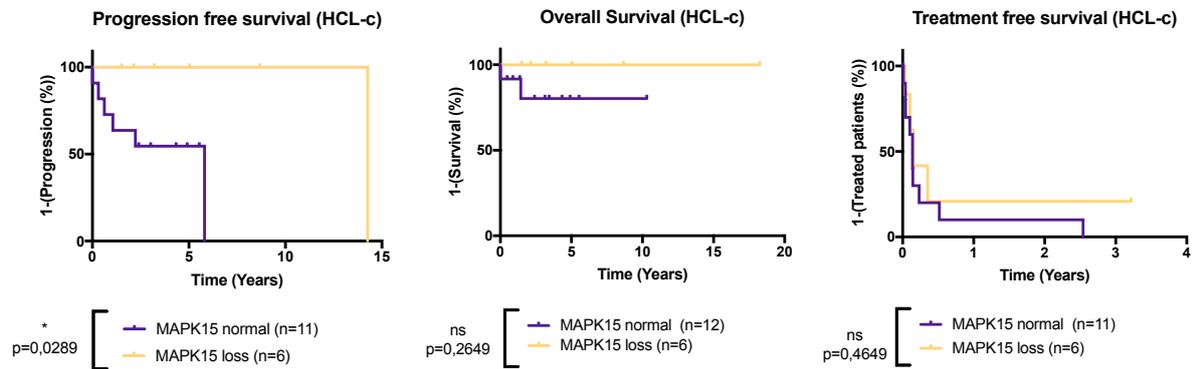


Figure 28 | La délétion de *MAPK15* améliore la PFS chez les patients étudiés

Représentation de Kaplan-Meier de la survie sans progression (PFS), de la survie globale (OS) et de la durée sans traitement (TFS) des patients HCL-c selon leur nombre de copies de *MAPK15*. Les *p-values* ont été calculées avec le *log-rang* test.

Discussion

I. Le Trichopanel : un outil d'intérêt

Le Trichopanel nous a permis de mettre en évidence des SNV chez 96% des patients (23/24), nous pouvons donc conclure que le *design* est informatif.

1. Lignées cellulaires : des modèles atypiques

Comme attendu, les lignées cellulaires provenant de patients atteints d'HCL (BONNA-12 et JOK-1) sont atypiques et ne portent pas la mutation $BRAF^{V600E}$ [123]. Cette donnée suppose plusieurs hypothèses :

- Une erreur de diagnostic lors de l'établissement des lignées cellulaires, dans les années 1980-1990 [124,125]. La découverte de la mutation $BRAF^{V600E}$ étant postérieure à l'établissement des lignées, les patients pourraient être atteints de la forme variante de la maladie plutôt que de la forme classique.
- La perte de la mutation *driver* lors de l'immortalisation des lignées. Nous pouvons supposer que la mutation $BRAF^{V600E}$ est essentielle à l'induction de la tumorigénèse mais n'est plus nécessaire lorsque la cellule a acquis assez d'évènements génétiques favorables à la survie et la prolifération. L'analyse cytogénétique de ces lignées a montré un caryotype très complexe :
 - BONNA-12 : 47,X,-Y,+9,+12 [4]/47,sl,-9,+der(9)t(9,10),[10]
 - JOK-1 : 48,XY,t(1;4(p32;q35),der(6)+der(7)(t(7;11),der(8) [2]
/48,sl,der(14)[7]

La mutation $BRAF^{V600E}$ étant stable chez les patients atteints d'HCL-c, il est donc raisonnable de penser que ces lignées dérivent de patients atteint de la forme variante de la maladie. Cependant, les mutations retrouvées : $NOTCH1^{T2466M}$ dans BONNA-12, $TP53^{Y234H}$ et $TP53^{R213Q}$ dans JOK-1 ne sont pas spécifiques de l'une ou l'autre maladie, et ne nous permettent pas de conclure.

JVM3 est une lignée cellulaire dérivant d'une leucémie polylmphocytaire B. Cette lignée porte la mutation $BRAF^{K601N}$; une mutation déjà décrite dans de rares cas de

mélanome et qui induirait une activation de la voie des MAPK [126]. La seconde mutation retrouvée dans JVM3 touche un gène de la régulation épigénétique : *ARID1B*^{P1435L}. Cette mutation n'a jamais été décrite et n'est à ce jour, pas caractérisée sur un plan phénotypique. Cependant, compte tenu de l'importance des gènes de la régulation épigénétique dans les hémopathies lymphoïdes B, cette mutation a probablement un intérêt [32].

2. Les patients atteints d'HCL-c ont des mutations récurrentes

2-1. La mutation *BRAF*^{V600E} : mutation driver

En accord avec la littérature, 90% des patients atteints d'HCL-c étaient porteurs de la mutation *BRAF*^{V600E}. La proportion de patients *BRAF*^{WT} diffère selon les séries, de 0% à 20% des cas [30,57]. Une étude a mis en évidence des mutations alternatives dans l'exon 11 de *BRAF* chez certains patients [83]. Dans notre étude, les deux patients *BRAF*^{WT} n'avaient pas de mutations alternatives dans les exons 11 ou 15. Le diagnostic de leucémie à tricholeucocytes classique a été confirmée sur les données d'immunophénotypage (score HCL à 4/4) et de la cytologie avec l'absence de nucléoles. L'absence de la mutation *BRAF*^{V600E} dans l'HCL-c est fréquemment associée à un réarrangement des *IGHV* de type VH4-34 [57], cependant, le statut des *IGHV* n'a pas été réalisé dans cette étude.

La fréquence allélique des mutations *BRAF*^{V600E} était compatible avec un statut hétérozygote, ce qui est classiquement le cas dans le cadre d'une mutation activatrice d'un oncogène.

2-2. Mutations associées à *BRAF*^{V600E}

L'analyse des patients a révélé la présence de mutations additionnelles à *BRAF* chez un tiers des patients atteints d'HCL-c (6/18). Ces données confirment les données de la littérature. Les gènes impliqués étaient *KLF2* (n=3), *CDKN1B* (n=2) et *NOTCH1* (n=1). Les ratios fréquences alléliques de ces mutations étaient proches de

ceux de $BRAF^{V600E}$ (rVAF = $0,47 \pm 0,16$) ce qui indique une atteinte précoce. Cette donnée va dans le sens de l'hypothèse selon laquelle l'accumulation d'anomalies génétiques autres que $BRAF^{V600E}$ serait nécessaire à la leucémogénèse [26]. De plus, deux patients (UPN-25 et UPN-38) avaient des mutations sous-clonales additionnelles dans $CDKN1B^{W76X}$ (rVAF=0,09) et $KLF2^{T284S}$ (rVAF=0,16) respectivement. La caractérisation de ces sous-clones est nécessaire pour le management des futurs traitements et pour éviter la promotion de sous-clones durant la rechute.

Quatre mutations dans $KLF2$ ont été détectées chez 3 patients soit 15% des patients HCL-c (3/20). Ce taux est comparable à celui retrouvé dans la littérature reporté dans 10 à 16% des cas [99,120]. $KLF2$ est un facteur de transcription impliqué dans le *homing* et la différenciation. Il permet notamment l'expression du CD62L, une sélectine impliquée dans la localisation ganglionnaire des lymphocytes [127]. $KLF2$ est aussi un facteur de régulation négatif de la voie NF- κ B [121]. Dans un modèle murin, le *knock-out* (KO) de $KLF2$ n'est pas suffisant pour induire des lymphomes mais provoque une dérégulation de la différenciation et de la motilité des lymphocytes B [127,128].

Les mutations retrouvées dans le Trichopanel : $KLF2^{275N}$, $KLF2^{275T}$ et $KLF2^{T271I}$, étaient localisées près du domaine en doigt de Zinc ou du signal d'export nucléaire. Ces mutations ont déjà été décrites dans le SMZL comme probablement délétères [99,120]. De plus, des mutations impliquant le domaine d'export nucléaire semblent affecter l'activité facteur de transcription de $KLF2$ *via* une relocalisation cytoplasmique de la protéine [120]. Dans l'HCL-c, il a été décrit une diminution d'expression de CD62L [129] et une surexpression des gènes régulés par NF- κ B [49].

L'ensemble de ces données suggèrent que les mutations de $KLF2$ dans l'HCL-c favoriseraient la localisation extra-ganglionnaire de la maladie et la dérégulation de la voie NF- κ B. Parmi les patients étudiés, les altérations de $KLF2$ ne sont pas corrélées à un tableau clinique ou une évolution particulière.

Un patient (UPN-38) avait deux mutations de $KLF2$: $KLF2^{T271I}$ (rVAF=0,42) et $KLF2^{T284S}$ (rVAF=0,16). Des mutations multiples de $KLF2$ (entre 2 et 5) ont été décrites précédemment chez des patients atteints de lymphomes diffus à grande cellule (n=7), des SMZL (n=2), un lymphome de Burkitt et un HCL-c. Dans la majorité des cas, les

mutations de KLF2 étaient localisées sur des allèles différents [120]. Dans le cas d'UPN-38 les mutations étaient détectées sur des *reads* différents (Annexe 5 : Figure S1). Nous pouvons en déduire que les deux mutations sont soit portées sur deux allèles différents du gène, soit sur deux populations clonales différentes.

Des altérations du cycle cellulaire et de l'apoptose sont fréquentes dans les hémopathies. Dans cette étude deux patients HCL-c avaient des mutations dans *CDKN1B* (2/20, 10%) mais aucun n'a de mutation dans *TP53*. Ces données sont cohérentes avec les données de la littérature précédemment publiées avec un taux de mutation de *CDKN1B* dans 11 à 16% des cas d'HCL-c [60,91]. La fréquence des mutations dans *TP53* diffère considérablement d'une étude à une autre entre 0-2% jusqu'à 27% [51,88,91].

L'étude moléculaire de la cohorte de patients atteints d'HCL a permis de mettre en évidence une corrélation entre les mutations de *CDKN1B* et le phénotype CD10+. En effet, les deux patients avec les mutations *CDKN1B*^{X199S} (UPN-2) et *CDKN1B*^{W76X} (UPN-25), avaient une expression atypique du CD10 sur les tricholeucocytes. A ce jour, il n'y a aucune donnée dans la littérature confirmant ce lien. Cependant, les proportions de patients ayant une mutation dans *CDKN1B* et de patients ayant une HCL CD10+ sont comparables (environ 10-20% dans chaque cas) [60,75,76]. L'expression du CD10 a été récemment corrélée à l'envahissement extra-médullaire [130] ; mais cette donnée n'a pas été confirmée sur une série plus ancienne [76]. Dans notre étude, les patients CD10+ n'ont pas une évolution significativement différente des autres patients. Il serait ainsi intéressant d'élargir la cohorte d'HCL afin de rechercher un excès d'HCL CD10+ chez les patients mutés dans *CDKN1B*, et une éventuelle implication clinique.

3. Analyse des patients *BRAF*^{V600E} négatifs : un profil atypique

Deux patients atteints d'HCL-c et quatre patients atteints d'HCL-v, n'ont pas la mutation *BRAF*^{V600E}. Chez ces patients aucune mutation alternative (exons 11 et 15) n'a été retrouvée.

Dans le premier cas d'HCL-c (UPN-10), l'absence de $BRAF^{V600E}$ était inattendue. En effet, ce patient avait été diagnostiqué $BRAF^{V600E}$ positif à 0,2% (seuil de détection 0,01%) par la technique de dépistage en routine. La technique utilisée en routine repose sur une PCR en temps réel utilisant une technique dite « allèle spécifique » (*Amplification Refractory Mutation System* (ARMS®-qPCR)). En cas de mésappariement de l'amorce, l'amplification est diminuée, réduisant ainsi le signal en fluorescence. Afin d'éliminer un faux positif, l'ADN a de nouveau été étudié conjointement sur les deux techniques et le résultat a été identique : négatif en NGS (profondeur de lecture 300X) et positif en ARMS®-qPCR. L'infiltration tumorale chez ce patient étant de 15%, la profondeur de 300X en NGS aurait dû être suffisante pour détecter le SNV. Aucune altération additionnelle n'a été détectée sur les gènes du Trichopanel cependant, le profil d'immunophénotypage (score HCL à 4/4) et l'aspect cytologique permettent de conclure à un HCL-c $BRAF^{V600E}$ négatif.

3-1. Mutations dans *MAP2K1*

Parmi les six patients $BRAF^{WT}$, trois ont une mutation dans *MAP2K1*. Cette donnée est concordante avec une étude publiée retrouvant des mutations de *MAP2K1* dans 48% des HCL $BRAF^{WT}$ (HCL-c et HCL-v incluses) [58]. Plus précisément les mutations de *MAP2K1* étaient retrouvées dans 86% (6/7) des patients HCL-c $BRAF^{WT}$ et 42% (10/24) des patients HCL-v. Comme attendu, nous confirmons dans cette étude que les mutations dans *MAP2K1* et *BRAF* sont mutuellement exclusives [58].

Les mutations $MAP2K1^{Q56P}$ et $MAP2K1^{K57N}$ (UPN-v3 et UPN-40 respectivement) sont proches du domaine de régulation négative du gène et ont été décrites comme activant la phosphorylation de ERK [131,132]. Cependant, alors que $MAP2K1^{K57N}$ induirait une augmentation de la sensibilité aux inhibiteurs de MEK, $MAP2K1^{Q56P}$ provoquerait au contraire une résistance [132,133].

La mutation $MAP2K1^{I103N}$ (UPN-v1) est située près de l'hélice-C, le site de liaison avec les inhibiteurs de MEK, et conférerait ainsi une résistance directe aux inhibiteurs [131]. Il n'a pas été démontré dans la littérature que la mutation $MAP2K1^{I103N}$ entrainerait une activation de la voie MAPK. Ainsi, la mutation ne serait pas activatrice

de MEK mais pourrait conférer une résistance aux inhibiteurs de MEK en altérant la liaison allostérique de la drogue [132]. Chez le patient UPN-v1, *MAP2K1*^{1103N} était sous-clonale au diagnostic avec un rVAF de 0,07 et considérablement augmentée au moment de la rechute (rVAF=0,41). Une hypothèse possible est que cette mutation serait d'apparition tardive, car n'apporterait pas d'avantage sur la prolifération et la survie. Cependant, *MAP2K1*^{1103N} pourrait entraîner un phénotype mauvais répondeur même en l'absence de traitement par un inhibiteur de MEK. En effet UPN-v1 a été traité par l'association rituximab-cladribine puis moxétumomab-pasudotox en seconde ligne.

Le sous-clone résistant peut prendre l'avantage sur les autres cellules tumorales et induire une rechute. La recherche de ces mutations est donc nécessaire avant la mise en place du traitement.

3-2. Les mutations dans les gènes de la régulation épigénétique sont récurrentes dans l'HCL-v

Les patients ne présentant pas d'altérations de *BRAF* (HCL-c n=2 et HCL-v n=4) avaient plus souvent des gènes de la régulation épigénétique mutés. Ainsi, parmi ces patients 5/6 (contre 1/18), étaient porteurs de mutations sur des gènes de la régulation épigénétique (*ARID1A* n=2, *KDM6A* n=2, *CREBBBP* n=1).

L'étude de la cohorte par séquençage à haut débit, a permis de mettre en évidence l'intérêt du gène *KDM6A* dans les formes variantes de la maladie. Ce gène est muté chez deux patients HCL-v (UPN-v1 et UPN-v2). Ces patients, de sexe masculin, sont hémizygotes pour la mutation car ce gène est localisé sur le chromosome X. La présence de gènes suppresseurs de tumeur dans le chromosome X peut expliquer le déséquilibre du sexe ratio homme/femme dans certains cancers [13]. La leucémie à tricholeucocytes a d'ailleurs, un sexe ratio de 3,9/1 [9].

Dans un modèle classique, une mutation hétérozygote d'un gène suppresseur de tumeur n'est pas suffisante pour être tumorigène. La seconde copie « saine » peut à elle seule restaurer la fonction de la protéine. La perte de fonction des deux copies est nécessaire, soit par l'acquisition d'une seconde mutation (mutation homozygote ou

double hétérozygote) soit par la perte de copie de l'allèle « sain » (on parlera alors de mutation hémizygote).

L'équipe de Dunford *et al.* a montré que des gènes suppresseurs de tumeurs portés sur le chromosome X (*ATRX*, *CNKSR2*, *DDX3X*, *KDM5C*, *KDM6A*, et *MAGEC3*) échapperaient au phénomène de Lyonisation de l'X. Les sujets de sexe féminin auraient donc 2 copies du gène suppresseur de tumeur. Les sujets masculins n'ont qu'un chromosome X et donc qu'une copie des gènes suppresseur de tumeur. L'acquisition d'une mutation sur ces gènes sera ainsi d'emblée délétère.

KDM6A, aussi appelé *Ubiquitously Transcribed Tetra-trico-peptide Repeat Protein X-Linked* (UTX), code une protéine nucléaire de la famille des lysine-déméthylases. Cette famille de protéines joue un rôle dans la régulation épigénétique par déméthylation de la lysine 27 des histones 3 (H3K27). Des mutations délétères ont été décrites dans des myélomes multiples, des cancers de la vessie et des leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) [134].

Les mutations dans *KDM6A* entraînent une perte de fonction de la protéine et ont déjà été décrites chez trois patients atteints d'HCL-c [58,60,91]. Deux de ces patients étaient atypiques :

- l'un avait une mutation *stop-gain* de *KDM6A* retrouvée seulement à la rechute, probablement liée au traitement par vemurafenib [60]
- l'autre patient était de type *BRAF^{WT}* avec des *IGHV* non mutées et de sous type VH4-34 [58]. Ce sous type est connu pour être résistant aux traitements classiques [51].

Des mutations délétères de *KDM6A* ont récemment été mises en évidence chez un patient atteint de SDRPL et un patient atteint d'HCL-v [63,91]. Dans notre cohorte, les deux patients touchés sur *KDM6A* sont réfractaires à la première ligne de traitement, avec une PFS médiane de 15,07 mois [4,13-26] contre 25,05 mois [3,25-166,5] chez les patients HCL-c. Un des patients (UPN-v1), n'a pas répondu aux traitements de seconde ligne (moxetumomab-pasudotox). Il semblerait ainsi que la perte de fonction de *KDM6A* confère un phénotype non-répondeur.

Les mutations de KDM6A décrites et celles retrouvées chez nos deux patients provoqueraient la perte du domaine C-terminal hautement conservé (incluant les domaines Jumonji et de liaison au Zinc). Le domaine C-terminal est essentiel à l'activité déméthylase de la protéine [135]. Une récente étude a démontré que KDM6A agit comme un antagoniste d'EZH2 [136]. Ainsi, la perte d'activité de KDM6A pourrait sensibiliser les cellules aux agents déméthylants et notamment aux inhibiteurs d'EZH2 [136]. Une autre étude a montré qu'une mutation inactivatrice de *KDM6A* (*KDM6A*^{R1279X}) dans une lignée cellulaire de LAL-T, augmenterait la sensibilité au DZNEP, un composé ciblant la méthylation de H3K27 [137]. Ainsi, la perte de fonction de KDM6A chez les patients pourrait être compensée par l'utilisation d'agents hypométhylants de type 5-azacytidine ou l'utilisation d'inhibiteurs d'EZH2, comme le tazemetostat, déjà utilisé en essai clinique dans des DLBCL.

Des études plus poussées sont nécessaires afin de confirmer la perte de fonction de la protéine chez ces patients. Il serait notamment intéressant de rechercher par immunoblot le défaut de déméthylation de l'histone H3. Il serait aussi souhaitable de rechercher cette mutation dans une plus grande cohorte de patients afin de mieux évaluer sa fréquence et son impact sur la progression et/ou la survie. Des études fonctionnelles sont aussi nécessaires pour évaluer l'intérêt des agents hypométhylants chez ces patients.

4. *Evolution clonale de la maladie*

Comme cela a déjà été décrit dans le LLC [138], l'analyse des prélèvements au diagnostic et à la rechute a mis en évidence une hétérogénéité tumorale avec une évolution sous-clonale au cours de la maladie.

Les tricholeucocytes du patient UPN-40 ont acquis deux nouvelles mutations à la rechute : *BCOR*^{E1430X} (rVAF=0,15) et *XPO1*^{E571K} (rVAF=0,06). L'apparition de ces mutations sous-clonales montre une évolution tumorale hétérogène et est probablement liée à l'acquisition de résistances/virulences. Ainsi le patient UPN-40 est actuellement traité en troisième ligne.

Le gène *BCOR* a récemment été retrouvé altéré de manière récurrente dans une série de SDRPL avec des mutations dans 15% des cas (6/40) et une perte de copies dans 4 autres cas [63]. *BCOR* est un gène répresseur de l'oncogène *BCL6*. La mutation sous-clonale *BCOR*^{E1430X} est de type non-sens et est donc considérée comme délétère. Ce gène est porté par le chromosome X, la mutation *BCOR*^{E1430X} serait donc hémizygote et pourrait provoquer une levée de répression de *BCL6*. Il n'est actuellement pas décrit de surexpression de *BCL6* dans les tricholeucocytes [22].

XPO1 code l'exportine 1, une protéine qui joue un rôle essentiel dans l'export nucléaire de protéine suppresseur de tumeur tel que p53, p27 et κ -B (un inhibiteur de la voie NF κ -B) [62]. La mutation *hotspot XPO1*^{E571K} est décrite dans le lymphome primitif du médiastin, le lymphome de Hodgkin et la LLC [117,139,140]. Le patient (UPN-40) présentait à la rechute la mutation *XPO1*^{E571K} avec une fréquence allélique très faible. L'impact de cette mutation dans l'HCL n'est actuellement pas connu.

Deux patients avaient des variations de la fréquence allélique des mutations entre le diagnostic et la rechute. UPN-v1 avait une augmentation de la fréquence allélique de *MAP2K1*^{I103N} (rVAF=0,07 au diagnostic et 0,41 à la rechute). UPN-v3 avait une diminution de la fréquence allélique du variant d'épissage dans *CREBBP* (rVAF=0,34 puis 0,06) et une augmentation de la mutation *MAP2K1*^{Q56P} (rVAF= 0,48 au diagnostic puis 0,93). Ce patient n'avait pas été traité entre les deux échantillons mais avait évolué défavorablement. Chez ces deux patients, on peut observer l'importance pour la cellule tumorale des mutations de *MAP2K1*.

Chez le patient UPN-v3, le ratio de fréquence allélique de *MAP2K1*^{Q56P} à la rechute est proche de 1 (rVAF=0,93). Cette perte d'hétérozygotie suppose deux hypothèses :

- Une hémizygotie par perte de copie dans l'allèle non muté. L'estimation de la perte de copies de *MAP2K1* n'a pas pu être évaluable par CNV du fait d'un nombre trop faible d'amplicons couvrant le gène (Annexe 6 : Figure S2)
- Une homozygotie, soit par l'acquisition de la même mutation sur l'allèle non muté, soit, plus probablement, par un mécanisme de disomie uniparentale.

La disomie uniparentale est un mécanisme chromosomique complexe, décrit initialement dans les maladies constitutionnelles, où, un défaut de méiose entraîne la duplication du même allèle parental dans le zygote. L'individu héritera ainsi d'une

empreinte parentale unique sur une partie du génome. Plus récemment, ce mécanisme a été décrit dans des cancers, où le défaut proviendrait à la mitose. L'allèle « non muté » est perdu puis le génome manquant est re-dupliqué à partir de l'allèle « muté » entraînant un profil homozygote de la mutation [141]. Ce mécanisme est particulièrement décrit dans les rechutes de leucémies aiguës [142].

5. La perte de copie de *MAPK15* est l'anomalie de copie la plus fréquente dans l'HCL-c

L'analyse des CNV a révélé que parmi les six patients *BRAF*^{WT}, quatre pourraient avoir une perte de copie du gène *BRAF* (par extrapolation de la perte d'*EZH2*). Chez un patient, UPN-v1, une délétion du chromosome 7 en position 22→36 a été détectée sur le caryotype. De manière similaire, le patient UPN-v2 était porteur d'une inversion en 7p15q34. Le gène *BRAF* étant positionné en 7q34, ces altérations génétiques sont la cause de la perte de copie de *BRAF*. Nous n'avons pas de caryotype disponible pour les deux autres patients. Cependant, nous pouvons supposer la présence d'une délétion en 7q34. La délétion en 7q est décrite dans 20% des cas d'HCL-c et d'HCL-v [54].

La variation du nombre de copies la plus fréquente est la perte d'une copie de *MAPK15* dans 37,5% des cas (9/24). *MAPK15* est un oncogène, dont la fonction précise n'est pas encore connue. *MAPK15* code la protéine ERK8 qui stabiliserait c-JUN, régulerait l'autophagie et la transformation [113,143]. Une surexpression de *MAPK15* a été décrite dans des cancers solides [143,144]. Sa délétion dans notre cohorte d'HCL-c, serait de bon pronostic et induirait un allongement de la PFS sans effets sur la survie globale et la durée sans traitements.

De plus, parmi les quatre patients HCL-v, deux ont une duplication du gène *ANXA1*. Cette donnée va à l'encontre des données de la littérature où la surexpression de l'annexine A1 est un marqueur utile au diagnostic des HCL-c et est négatif dans les HCL-v. Nous pouvons faire l'hypothèse que la duplication du gène n'entraînerait pas

d'augmentation du nombre de protéines traduites. L'implication de la duplication d'*ANXA1* chez ces patients atypiques doit cependant être explorée.

Dans la cohorte d'HCL aucun SNV n'a été retrouvé dans *TP53*, grâce à l'analyse des CNV, il semblerait qu'aucun patient ne présente de délétion de *TP53*. Cette donnée confirme les séries récentes dans lesquelles la Del17p n'est pas retrouvée [54]. Une confirmation par FISH de la délétion en 17p est cependant nécessaire.

6. Comparaisons des résultats avec les études publiées

La comparaison des résultats issus du Trichopanel à ceux de la littérature montre une fréquence semblable des altérations de *BRAF*, *MAP2K1* et *CDKN1B*. Nous n'avons cependant retrouvé aucun SNV dans les gènes : *DUSP2*, *MAPK15*, *EZH2*, *TP53*, *U2AF1*, *ABCA8* et *NOTCH2*.

Une étude publiée après la mise au point de notre panel de gènes, a révélé la présence fréquente de mutations dans les gènes *KMT2C* (8/53 HCL-c et 2/8 HCL-v respectivement), *CCND3* et *U2AF1* (1/8 HCL-v chacun respectivement) [91]. Les mutations de *CCND3* et *U2AF1* sembleraient être retrouvées exclusivement dans des cas d'HCL-v. Cependant, des mutations dans *CCND3* ont précédemment été décrites dans 21 à 24% des cas de SDRPL et 13% des cas de SMZL [63,145]. Ces données réunies semblent indiquer qu'il n'y a pas actuellement, de gènes spécifiques permettant de distinguer les HCL-v des SDRPL.

Conclusions et perspectives

L'objectif principal de cette étude était de caractériser cellulièrement et moléculairement un panel de tricholeucocytes pour étoffer les données encore très rares sur les mutations associées à la mutation *BRAF*^{V600E}, leurs fréquences, leurs éventuelles implications pronostiques et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Cette étude a mis en exergue la fréquence élevée de mutations additionnelles à *BRAF* dans l'HCL-c (33%). Le caractère précoce d'apparition de ces SNV confirme l'hypothèse selon laquelle la mutation *BRAF*^{V600E} serait un premier hit oncogénique mais insuffisant pour induire la maladie. De nouvelles mutations inactivatrices de *KDM6A* ont été mises en évidence pour la première fois. Des études complémentaires, portant sur une cohorte plus large, sont cependant nécessaires pour confirmer l'implication de *KDM6A* chez les patients HCL atypiques (patients réfractaires). En outre, la perte de fonction de *KDM6A* chez ces patients ouvre la voie à l'utilisation de nouvelles thérapies de type hypométhylant.

L'objectif secondaire était d'évaluer l'intérêt du Trichopanel dans le diagnostic des entités frontalières (HCL-v). Ainsi, grâce au Trichopanel nous avons pu mettre en évidence que des gènes de la régulation épigénétique étaient plus particulièrement altérés dans les formes *BRAF*^{WT}. La régulation épigénétique semble avoir un rôle important dans la leucémogénèse B.

Un prochain travail par l'équipe INSERM1245 va porter sur la caractérisation fonctionnelle des mutations portant sur les gènes régulant l'épigénétique dans l'HCL et l'éventuel intérêt d'utiliser des hypométhylants chez ces patients.

Il semble important de noter que le Trichopanel n'a pas été informatif pour un patient et n'a pas mis en évidence de mutations additionnelles chez 12 patients. Cette limite provient du choix restreint à 21 gènes qui permettait un compromis entre la couverture et la facilité d'utilisation. D'autres mécanismes cellulaires ou moléculaires sont certainement impliqués. Ainsi suite à la publication récente de l'équipe de Durham *et al.* il semblerait nécessaire d'ajouter les gènes *KMT2C* et *CCND3* au Trichopanel [91].

De plus, de par sa faible puissance, la cohorte de 24 patients ne permet pas de mettre en évidence de manière significative une corrélation entre certains gènes mutés et une diminution de la survie sans progression. Un élargissement de la cohorte va

donc être réalisé afin d'augmenter nos connaissances dans cette pathologie rare et peu documentée.

Ce travail a fait l'objet d'une publication affichée au congrès annuel de *l'American Society of Hematology* en décembre 2017. Un article est accepté et prochainement publié dans le journal *Oncotarget*.

Annexes

Annexe 1 | Tableau S1 : Caractéristiques de la cohorte de patients étudiée par NGS

UPN	Données épidémiologiques				Données cliniques				Numération Formule Sanguine				Immunophénotypage										Cytogénétique-Biologie moléculaire										
	Suivi (mois)	sexe (H/F)	âge au diagnostic	Diagnostic	Type de prélèvement	tt (1/0)	TTP (mois)	Rechute (1/0)	TTP (mois)	statut actuel	Hb (g/dL)	GB (G/L)	PNN (G/L)	Mono (G/L)	Ly (G/L)	Plq (G/L)	infiltration (%)	Score HCL	CD11c	CD103	CD123	CD25	CD5	CD23	CD43	CD38	CD10	chaîne légère	caryotype	IGHV (répertoire)	BRAP ^{NOUVE} ARMS-qPCR		
UPN-2	103,8033	H	45,860274	D	SANG	1	0,557	0	NA	RC	10,6	3,25	0,39	0,07	3,43	17	60%	≥3	1	1	nd	1	0	0	0	0	1	0	1	Kappa	nd	nd	1
UPN-4	nd	F	55,389041	D	SANG	nd	nd	nd	nd	nd	12	1,71	0,37	0,08	1,24	53	31%	4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	Kappa	nd	nd	1
UPN-5	16,4918	F	53,616438	D	SANG	nd	nd	nd	nd	nd	10,4	3,01	0,47	0,25	2,27	89	30%	4	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	Kappa	nd	nd	1
UPN-6	218,4918	H	42,00274	D	SANG	1	4,23	1	166,525	RC	nd	15	nd	nd	9	nd	96%	4*	1*	1	1*	1*	0	0	0	0*	0	0	0	Kappa	nd	nd	1
UPN-7	51,90164	H	51,567123	D	MOELLE	1	2,787	0	NA	RC	10,4	1,33	0,35	0,01	0,94	118	15%	4	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	Lambda	nd	nd	1
UPN-9	66,29508	H	71,276712	D	MOELLE	1	1,705	0	NA	RC	14,7	2,39	0,93	0,02	1,43	64	51%	≥3	1	1	nd	1	0	0	0	0	0	1	Lambda	nd	nd	1	
UPN-10	18,03279	H	70,841096	D	MOELLE	1	1,836	0	NA	RC	13,1	1,72	0,53	0,02	1,12	110	15%	4	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	Kappa	Normal	nd	1
UPN-11	41,18033	H	72,435616	D	MOELLE	1	1,672	1	25,0164	nd	13,8	2,31	0,69	0,07	1,46	99	33%	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	Lambda	nd	nd	1	
UPN-12	16,22951	H	63,930247	D	SANG	1	1,213	1	6,19672	DC	12,8	2,18	1,02	0,24	0,83	62	25%	≥3	1	1	nd	1	0	0	0	1	0	0	Lambda	nd	nd	1	
UPN-15	28,78689	H	45,682192	D	SANG	1	6,197	0	NA	RC	nd	nd	nd	nd	25	nd	82%	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	Kappa	nd	nd	1	
UPN-17	0	H	47,687671	D	SANG	0	nd	nd	nd	DC	6,7	9,8	0	0	9,8	38	86%	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	Indéterminé	nd	nd	1	
UPN-18	36,16393	F	67,726027	D	SANG	1	30,43	0	NA	RC	13,9	8,3	4,4	0,16	3,735	117	54%	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	Kappa	nd	nd	1	
UPN-19	38,52459	H	46,909589	D	MOELLE	0	38,52	0	NA	SD	13,9	3,22	1,29	0	1,93	179	34%	4	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	Kappa	nd	nd	1	
UPN-21	10,59016	F	41,90137	D	MOELLE	1	0,459	1	3,2459	RC	12,3	2,83	1,58	0	1,44	54	40%	4	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	Kappa	Normal	nd	1	
UPN-22	78,19672	H	63,512329	D	MOELLE	1	3,38	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13%	4	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	Kappa	nd	nd	1	
UPN-23	25,31148	H	60,70137	D	SANG	1	0,885	0	NA	RC	13,6	2,92	0,93	0	1,96	82	22%	4	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	Kappa	nd	nd	1	
UPN-24	123,4426	H	44,8	D	SANG	1	0,492	1	69,082	RC	8,8	9,56	1,05	0	8,5	49	61%	≥3	1	1	nd	1	0	0	0	0	0	0	Kappa	nd	nd	1	
UPN-25	58,78689	F	59,906849	D	MOELLE	1	1,672	0	nd	RC	7,7	2,44	0,2	0	2,24	50	73%	4	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	Lambda	nd	nd	1	
UPN-34	nd	H	92,375342	D	MOELLE	nd	nd	nd	nd	nd	13,4	6,16	1,87	0,98	3,24	45	55%	≥3	1	1	nd	1	0	0	0	0	0	0	Kappa	nd	nd	1	
UPN-38	60,72131	H	53,468493	D	MOELLE	1	0,787	0	NA	RC	9,2	3,89	0,31	0	3,58	34	66%	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	Lambda	nd	nd	1	
UPN-40	12,39344	H	78,305589	D	SANG	1	0,131	1	25,082	SD	nd	nd	nd	nd	28	nd	75%	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	Kappa	nd	nd	0	
UPN-v1	19,83607	H	64,284692	D	SANG	1	3,148	1	4,13115	SD	9,7	106	5,3	1,06	98,62	137	93%	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Lambda	del(7q)(p22q3,76)	nd	0	
UPN-v2	31,44262	H	72,334247	S	RATE	1	2	1	26	RC	10,6	6,41	2,47	0,49	3,17	68	15%	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Lambda	inh(7)(p15q34)	non muté (VH4-34)	0	
UPN-v3	19,86885	H	82,279452	D	SANG	0	19,87	0	NA	SD	11,6	5,89	1,52	0,29	3,5	78	66%	3	1	1	0#	1	0	0	1	0	0	0	Kappa	nd	nd	0	
UPN-v4	8,95082	H	67,076712	D	SANG	0	8,951	0	NA	SD	16,1	16,12	7,42	0,48	8,22	162	75%	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Lambda	en cours	nd	0	

Légende : 1 correspond à positif, 0 correspond à négatif, * correspond aux marqueurs réalisés sur un prélèvement de suivi.

Abréviations : H : homme; F : femme; tt: traitement, TTP : durée avant la mise sous traitement, TTP : survie sans progression; RC : Rémission complète, SD : maladie stable, DC : décès; Hb : hémoglobine; GB : leucocytes, PNN : polynucléaires neutrophiles; Mono : monocytes, Ly : lymphocytes, Plq : plaquettes # analyse effectuée sur un autre prélèvement.

Annexe 2 | Tableau S2 : Trichopanel : données de couverture et profondeur par patient

Echantillons	Nombre de reads alignés	Reads on-target (%)	Nombre total de bases alignées (pb)	Bases on target (%)	Base avec couverture > 20 reads (%)	Base avec couverture > 100 reads (%)	Uniformité (%)	Moyenne de profondeur (X)
UPN-2	143341	96.13	16335463	94.14	96.82	83.76	95.58	216.6
UPN-4	135122	96.56	15360378	94.93	96.81	83.50	95.16	205.3
UPN-5	215646	90.45	23933448	90.54	97.68	93.00	95.96	305.2
UPN-6	194491	93.23	21561138	92.7	96.55	88.15	94.56	281.5
UPN-7	274949	97.22	31682354	95.24	97.65	94.26	95.17	424.9
UPN-9	59761	94.69	6755694	93.29	94.79	34.38	95.28	88.75
UPN-10	209143	94.41	23775402	92.9	97.57	90.29	94.99	311.0
UPN-11	324649	95.9	37335287	94.06	98.05	95.51	95.67	494.5
UPN-12	78689	94.76	8902188	93.34	95.87	55.08	95.09	117.0
UPN-15	222338	96.8	25250123	94.99	97.49	92.39	94.99	337.7
UPN-17	285143	96.44	31970177	95.00	97.67	94.50	95.33	427.7
UPN-18	247554	96.2	27991800	94.61	97.52	94.03	95.60	372.9
UPN-19	169486	94.6	19329437	93.06	97.23	88.24	94.58	253.3
UPN-21	231134	96.84	25954819	95.09	97.43	93.87	95.82	347.5
UPN-23	252082	96.82	28565546	95.05	97.55	93.48	94.49	382.3
UPN-24	349512	96.41	39997503	94.55	97.66	95.30	94.91	532.5
UPN-25	278394	95.74	31766338	94.06	97.78	95.87	96.38	420.8
UPN-34	219592	95.33	25317456	95.52	97.39	93.39	95.29	333.4
UPN-38	173722	87.76	19202025	88.37	97.63	86.85	95.58	238.9
UPN-40	107318	94.35	12127824	92.81	96.59	69.69	94.58	158.5
UPN-v1	284040	97.07	32410731	95.26	97.85	93.76	94.45	434.8
UPN-v2	161534	95.58	18981205	93.25	97.37	89.02	95.04	249.3
UPN-v3	228853	94.57	25647245	93.38	97.62	93.18	95.43	337.3
UPN-v4	183391	96.22	20677947	94.54	97.48	89.43	94.99	275.3
Moyenne	209578.5	95.17	23784647	93.78	97.25	88.08	95.21	314.46
SD	73292.57	2.17	8391393.86	1.63	0.72	13.05	0.49	112.96
Médiane	217619	95.82	24591785.5	94.1	97.505	93.00	95.165	322.2
Min	59761	87.76	6755694	88.37	94.79	34.38	94.45	88.75
Max	349512	97.22	39997503	95.52	98.05	95.87	96.38	532.5

Annexe 3 | Tableau S3 : Résultats de NGS par patient

UPN	Infiltration (%)	BRAF		MAP2K1		CDKN1B		KIF2		ARID1A		KDM6A		NOTCH1		CREBBP		ABCA8		ANKK1		TP53		EZH2		MAPK15	
		SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)	SNV	VAR (%)
UPN-2	60%	(p.V600E)	33,33	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-4	31%	(p.V600E)	22,22	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-5	30%	(p.V600E)	17,2	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-6	96%	(p.V600E)	35,96	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-7	15%	(p.V600E)	5,52	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-9	51%	(p.V600E)	17,14	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-10	15%	(p.V600E)	17,14	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-11	33%	(p.V600E)	16,96	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-12	25%	(p.V600E)	14,55	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-15	82%	(p.V600E)	44,65	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-17	86%	(p.V600E)	39,74	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-18	54%	(p.F595L)	33,33	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-19	34%	(p.V600E)	15,92	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-21	40%	(p.V600E)	11,37	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-23	22%	(p.V600E)	11,93	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-24	61%	(p.V600E)	27,78	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-25	73%	(p.V600E)	42,94	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-34	55%	(p.V600E)	17,24	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-38	66%	(p.V600E)	31,47	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-40	75%	(p.K57N)	39,19	-1		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-v1	93%	(p.I103N)	6,18	-1		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-v2-R1	83%	(p.Q56P)	31,71	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-v3	66%	(p.V600E)	17,24	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
UPN-v4	75%	(p.V600E)	31,47	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	

Légende : 1 correspond à gain d'une copie, 0 correspond à un nombre de copies normal, -1 correspond à une perte de copie

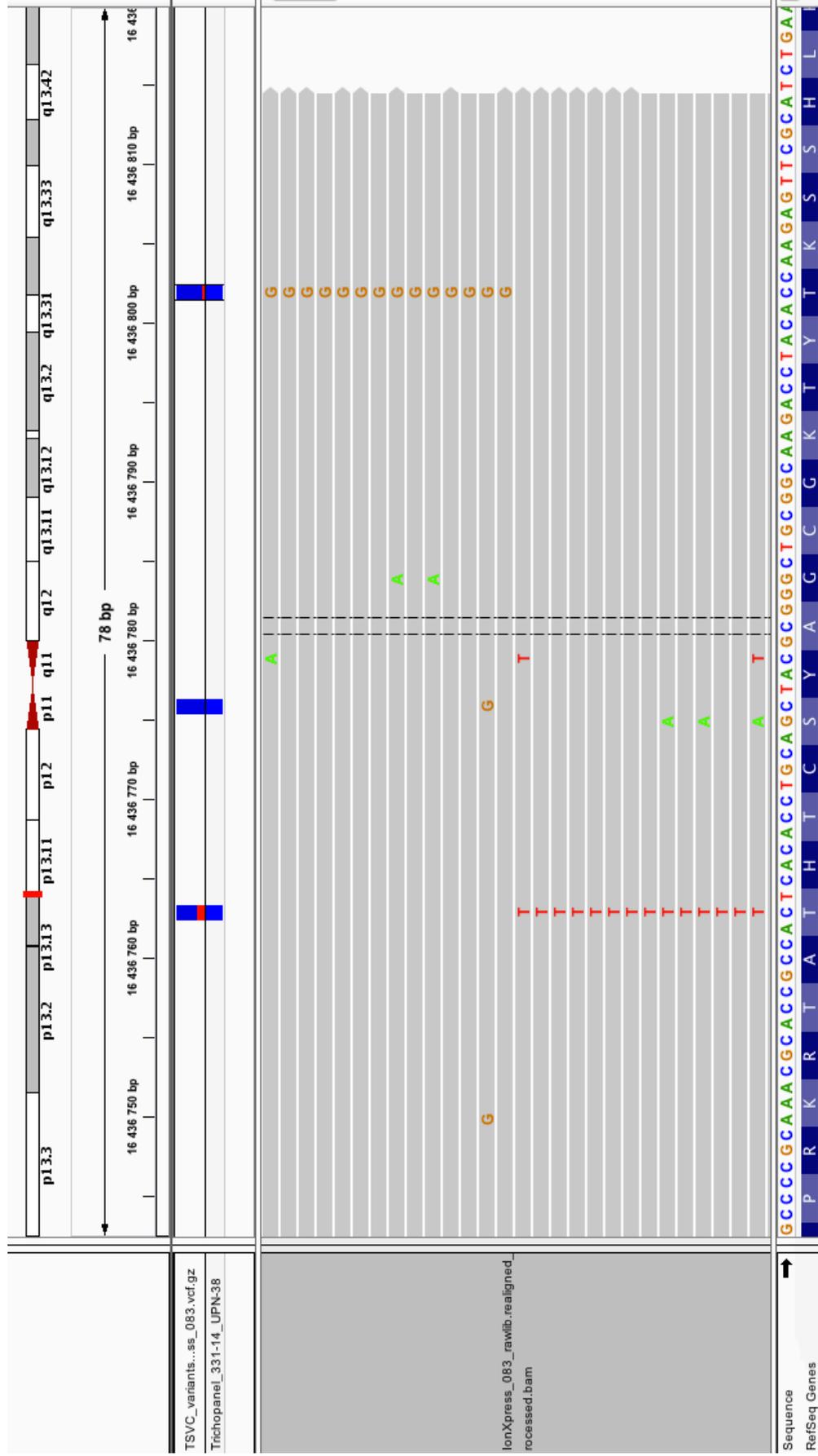
Abréviations : CNV : nombre de copies, SNV : Variant nucléotidique, VAR : fréquence allélique

Annexe 4 | Tableau S4 : Données de NGS pour les lignées cellulaires

Lignées cellulaires	Gene	Chr	Position	Infiltration (%)	VAF (%)	rVAF	Variation chromosomique*	Profondeur	NM_code	ADN	Proteine	Type de Mutation	CADD	SIFT	Polyphen-2	ALAMUT	COSMIC database
BONNA-12	NOTCH1	9	139390794	100	32.29	0.32	Trisomie partielle du chr 9	628	NM_017617	c.C7397T	p.T2466M	nonsynonymous SNV	beginn	damaging	damaging	NA	COSM12778
JOK-1	TP53	17	7577581	100	48.11	0.48	Euploïdie du chr 17	433	NM_000546	c.T700C	p.Y234H	nonsynonymous SNV	damaging	damaging	damaging	NA	COSM238605
JOK-1	TP53	17	7578211	100	53.72	0.54	Euploïdie du chr 17	289	NM_000546	c.G638A	p.R213Q	nonsynonymous SNV	damaging	damaging	damaging	NA	COSM10735
JVM-3	ARID1B	6	615752032	100	25.28	0.25	Tetraploïdie du chr 6	334	NM_020732	c.C4304T	p.P1435L	nonsynonymous SNV	beginn	damaging	possibly	NA	COSM1183556
JVM-3	BRAF	7	140453132	100	49.54	0.50	Tetraploïdie du chr 7 avec del(7q)x2	320	NM_004333	c.A1803T	p.K601N	nonsynonymous SNV	damaging	damaging	damaging	NA	COSM6265

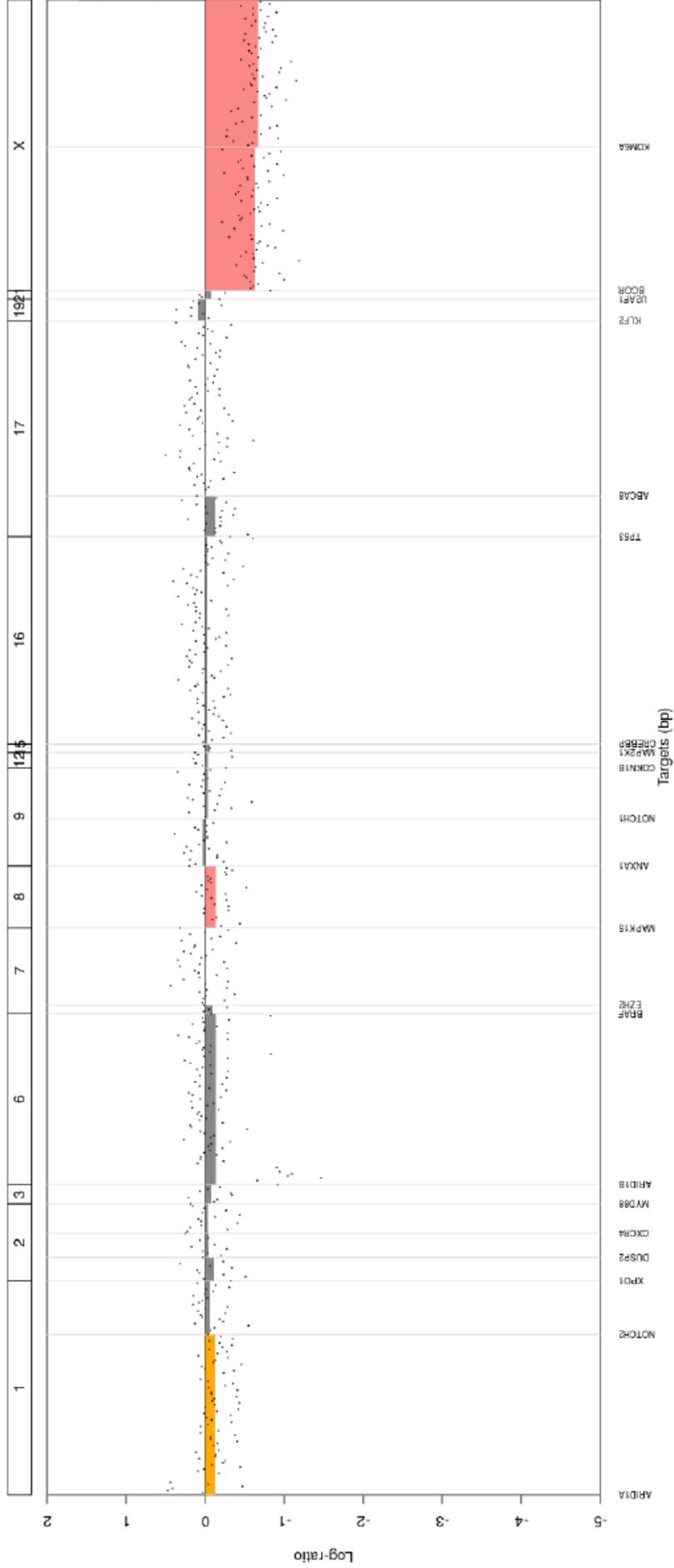
* Variation chromosomique évaluée sur le caryotype

Annexe 5 | Figure S1 : Représentation IGV des reads amplifiés d'UPN-38 dans KLF2



Les mutations c. C812T-(p. T271I) en rouge et c. C851G-(p. T284S) en marron ne sont pas retrouvées dans les mêmes reads.

Annexe 6 | Figure S2 : Représentation des CNV de UPN-v3



Les pertes de copies sont représentées en rouge et orange (Generate report).



New Generation Sequencing of Targeted Genes in Hairy Cell Leukemia Highlighted Mutations Associated to BRAF^{V600E} and a New Recurrent Altered Gene, KDM6A, in Variant Patients.

ASH 2017 N° 1727

X. Troussard^{1,3,5}, E. Maitre¹, P. Bertrand², C. Maingonnat², P.J. Vialily², V. Selauc³, D. Naguib³, E. Cornet^{1,3}, G. Damaj⁵, B.Sola¹, F. Jardin^{2,4}
¹INSERM1245 Caen University, ²INSERM1245 Rouen University, ³Laboratoire d'Hématologie Centre Henri Becquerel, ⁴Service d'hématologie de Basse-Normandie CHU Caen

Introduction

BRAF^{V600E} detected in more than 80% of the cases of Hairy cell leukemia (HCL-c), was described as a driver mutation but additional genetic abnormalities seem necessary for the progression of the disease.

Within HCL harboring a wild-type BRAF gene, the differential diagnosis with the variant form of HCL (HCL-v) can be complex. Sequencing of targeted genes by next generation sequencing (NGS) has proved its interest for the classification and prognosis of lymphoid neoplasms and opens the lead to new perspectives for personalized medicine¹.

Method

We selected a panel of 21 relevant genes (defined as the Trichopanel) based on literature review of whole exome sequencing studies^{2,3,4}. We analyzed 20 HCL-c patients (including 2 serial samples at diagnosis and relapse) and 4 HCL-v (including 3 serial samples at diagnosis and relapse)

Table 1: patients characteristics

Age (years)	Sex	Site	Diagnosis	Relapse
55	M	Spleen	2013	2015
62	F	Spleen	2013	2015
68	F	Spleen	2013	2015
72	F	Spleen	2013	2015
75	F	Spleen	2013	2015
78	F	Spleen	2013	2015
82	F	Spleen	2013	2015
85	F	Spleen	2013	2015
88	F	Spleen	2013	2015
92	F	Spleen	2013	2015
95	F	Spleen	2013	2015
98	F	Spleen	2013	2015
102	F	Spleen	2013	2015
105	F	Spleen	2013	2015
108	F	Spleen	2013	2015
112	F	Spleen	2013	2015
115	F	Spleen	2013	2015
118	F	Spleen	2013	2015
122	F	Spleen	2013	2015
125	F	Spleen	2013	2015
128	F	Spleen	2013	2015
132	F	Spleen	2013	2015
135	F	Spleen	2013	2015
138	F	Spleen	2013	2015
142	F	Spleen	2013	2015
145	F	Spleen	2013	2015
148	F	Spleen	2013	2015
152	F	Spleen	2013	2015
155	F	Spleen	2013	2015
158	F	Spleen	2013	2015
162	F	Spleen	2013	2015
165	F	Spleen	2013	2015
168	F	Spleen	2013	2015
172	F	Spleen	2013	2015
175	F	Spleen	2013	2015
178	F	Spleen	2013	2015
182	F	Spleen	2013	2015
185	F	Spleen	2013	2015
188	F	Spleen	2013	2015
192	F	Spleen	2013	2015
195	F	Spleen	2013	2015
198	F	Spleen	2013	2015
202	F	Spleen	2013	2015
205	F	Spleen	2013	2015
208	F	Spleen	2013	2015
212	F	Spleen	2013	2015
215	F	Spleen	2013	2015
218	F	Spleen	2013	2015
222	F	Spleen	2013	2015
225	F	Spleen	2013	2015
228	F	Spleen	2013	2015
232	F	Spleen	2013	2015
235	F	Spleen	2013	2015
238	F	Spleen	2013	2015
242	F	Spleen	2013	2015
245	F	Spleen	2013	2015
248	F	Spleen	2013	2015
252	F	Spleen	2013	2015
255	F	Spleen	2013	2015
258	F	Spleen	2013	2015
262	F	Spleen	2013	2015
265	F	Spleen	2013	2015
268	F	Spleen	2013	2015
272	F	Spleen	2013	2015
275	F	Spleen	2013	2015
278	F	Spleen	2013	2015
282	F	Spleen	2013	2015
285	F	Spleen	2013	2015
288	F	Spleen	2013	2015
292	F	Spleen	2013	2015
295	F	Spleen	2013	2015
298	F	Spleen	2013	2015
302	F	Spleen	2013	2015
305	F	Spleen	2013	2015
308	F	Spleen	2013	2015
312	F	Spleen	2013	2015
315	F	Spleen	2013	2015
318	F	Spleen	2013	2015
322	F	Spleen	2013	2015
325	F	Spleen	2013	2015
328	F	Spleen	2013	2015
332	F	Spleen	2013	2015
335	F	Spleen	2013	2015
338	F	Spleen	2013	2015
342	F	Spleen	2013	2015
345	F	Spleen	2013	2015
348	F	Spleen	2013	2015
352	F	Spleen	2013	2015
355	F	Spleen	2013	2015
358	F	Spleen	2013	2015
362	F	Spleen	2013	2015
365	F	Spleen	2013	2015
368	F	Spleen	2013	2015
372	F	Spleen	2013	2015
375	F	Spleen	2013	2015
378	F	Spleen	2013	2015
382	F	Spleen	2013	2015
385	F	Spleen	2013	2015
388	F	Spleen	2013	2015
392	F	Spleen	2013	2015
395	F	Spleen	2013	2015
398	F	Spleen	2013	2015
402	F	Spleen	2013	2015
405	F	Spleen	2013	2015
408	F	Spleen	2013	2015
412	F	Spleen	2013	2015
415	F	Spleen	2013	2015
418	F	Spleen	2013	2015
422	F	Spleen	2013	2015
425	F	Spleen	2013	2015
428	F	Spleen	2013	2015
432	F	Spleen	2013	2015
435	F	Spleen	2013	2015
438	F	Spleen	2013	2015
442	F	Spleen	2013	2015
445	F	Spleen	2013	2015
448	F	Spleen	2013	2015
452	F	Spleen	2013	2015
455	F	Spleen	2013	2015
458	F	Spleen	2013	2015
462	F	Spleen	2013	2015
465	F	Spleen	2013	2015
468	F	Spleen	2013	2015
472	F	Spleen	2013	2015
475	F	Spleen	2013	2015
478	F	Spleen	2013	2015
482	F	Spleen	2013	2015
485	F	Spleen	2013	2015
488	F	Spleen	2013	2015
492	F	Spleen	2013	2015
495	F	Spleen	2013	2015
498	F	Spleen	2013	2015
502	F	Spleen	2013	2015
505	F	Spleen	2013	2015
508	F	Spleen	2013	2015
512	F	Spleen	2013	2015
515	F	Spleen	2013	2015
518	F	Spleen	2013	2015
522	F	Spleen	2013	2015
525	F	Spleen	2013	2015
528	F	Spleen	2013	2015
532	F	Spleen	2013	2015
535	F	Spleen	2013	2015
538	F	Spleen	2013	2015
542	F	Spleen	2013	2015
545	F	Spleen	2013	2015
548	F	Spleen	2013	2015
552	F	Spleen	2013	2015
555	F	Spleen	2013	2015
558	F	Spleen	2013	2015
562	F	Spleen	2013	2015
565	F	Spleen	2013	2015
568	F	Spleen	2013	2015
572	F	Spleen	2013	2015
575	F	Spleen	2013	2015
578	F	Spleen	2013	2015
582	F	Spleen	2013	2015
585	F	Spleen	2013	2015
588	F	Spleen	2013	2015
592	F	Spleen	2013	2015
595	F	Spleen	2013	2015
598	F	Spleen	2013	2015
602	F	Spleen	2013	2015
605	F	Spleen	2013	2015
608	F	Spleen	2013	2015
612	F	Spleen	2013	2015
615	F	Spleen	2013	2015
618	F	Spleen	2013	2015
622	F	Spleen	2013	2015
625	F	Spleen	2013	2015
628	F	Spleen	2013	2015
632	F	Spleen	2013	2015
635	F	Spleen	2013	2015
638	F	Spleen	2013	2015
642	F	Spleen	2013	2015
645	F	Spleen	2013	2015
648	F	Spleen	2013	2015
652	F	Spleen	2013	2015
655	F	Spleen	2013	2015
658	F	Spleen	2013	2015
662	F	Spleen	2013	2015
665	F	Spleen	2013	2015
668	F	Spleen	2013	2015
672	F	Spleen	2013	2015
675	F	Spleen	2013	2015
678	F	Spleen	2013	2015
682	F	Spleen	2013	2015
685	F	Spleen	2013	2015
688	F	Spleen	2013	2015
692	F	Spleen	2013	2015
695	F	Spleen	2013	2015
698	F	Spleen	2013	2015
702	F	Spleen	2013	2015
705	F	Spleen	2013	2015
708	F	Spleen	2013	2015
712	F	Spleen	2013	2015
715	F	Spleen	2013	2015
718	F	Spleen	2013	2015
722	F	Spleen	2013	2015
725	F	Spleen	2013	2015
728	F	Spleen	2013	2015
732	F	Spleen	2013	2015
735	F	Spleen	2013	2015
738	F	Spleen	2013	2015
742	F	Spleen	2013	2015
745	F	Spleen	2013	2015
748	F	Spleen	2013	2015
752	F	Spleen	2013	2015
755	F	Spleen	2013	2015
758	F	Spleen	2013	2015
762	F	Spleen	2013	2015
765	F	Spleen	2013	2015
768	F	Spleen	2013	2015
772	F	Spleen	2013	2015
775	F	Spleen	2013	2015
778	F	Spleen	2013	2015
782	F	Spleen	2013	2015
785	F	Spleen	2013	2015
788	F	Spleen	2013	2015
792	F	Spleen	2013	2015
795	F	Spleen	2013	2015
798	F	Spleen	2013	2015
802	F	Spleen	2013	2015
805	F	Spleen	2013	2015
808	F	Spleen	2013	2015
812	F	Spleen	2013	2015
815	F	Spleen	2013	2015
818				

Bibliographie

1. Gosselin GR, Hanlon DG, Pease GL. Leukaemic reticuloendotheliosis. *Can Med Assoc J.* 1956; 74: 886.
2. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic Reticuloendotheliosis. *Blood.* 1958; XIII: 609–30.
3. Ewald O. Die leukämische reticuloendotheliose. *Dtsch Arch Klin Med.* 1923; 142: 222–8.
4. Catovsky D, Pettit JE, Galton DAG, Spiers ASD, Harrison CV. Leukaemic Reticuloendotheliosis ('Hairy' Cell Leukaemia): A Distinct Clinico-Pathological Entity. *Br J Haematol.* 1974; 26: 9–27.
5. Schrek R, Donnelly WJ. "Hairy" cells in blood in lymphoreticular neoplastic disease and "flagellated" cells of normal lymph nodes. *Blood.* 1966; 27: 199–211.
6. Andritsos LA, Grever MR. Historical overview of hairy cell leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015; 28: 166–74. doi: 10.1016/j.beha.2015.10.018.
7. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes: 2016 US Lymphoid Malignancy Statistics by World Health Organization Subtypes. *CA Cancer J Clin.* 2016; 66: 443–59. doi: 10.3322/caac.21357.
8. Orphanet. Prévalence des maladies rares : Données bibliographiques [Internet]. 2018 [cited 2018 Apr 27]. Available from http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/FR/Prevalence_des_maladies_rares_par_ordre_alphabetique.pdf
9. Frassoldati A, Lamparelli T, Federico M, Annino L, Capnist G, Pagnucco G, Dini E, Resegotti L, Damasiot EE, Silingardi V. Hairy cell leukemia: a clinical review based on 725 cases of the Italian Cooperative Group (ICGHCL). *Leuk Lymphoma.* 1994; 13: 307–16.
10. Tadmor T, Polliack A. Epidemiology and environmental risk in hairy cell leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015; 28: 175–9. doi: 10.1016/j.beha.2015.10.014.
11. Hardell L, Eriksson M, Nordström M. Exposure to Pesticides as Risk Factor for Non-Hodgkin's Lymphoma and Hairy Cell Leukemia: Pooled Analysis of Two Swedish Case-control Studies. *Leuk Lymphoma.* 2002; 43: 1043–9.
12. Monnereau A, Slager SL, Hughes AM, Smith A, Glimelius B, Habermann TM, Berndt SI, Staines A, Norman AD, Cerhan JR, Sampson JN, Morton LM, Clavel J. Medical History, Lifestyle, and Occupational Risk Factors for Hairy Cell Leukemia: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *JNCI Monogr.* 2014; 2014: 115–24. doi: 10.1093/jncimonographs/lgu004.
13. Dunford A, Weinstock DM, Savova V, Schumacher SE, Cleary JP, Yoda A, Sullivan TJ, Hess JM, Gimelbrant AA, Beroukhim R, Lawrence MS, Getz G, Lane AA. Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. *Nat Genet.* 2016; 49: 10–6. doi: 10.1038/ng.3726.
14. Cornet E, Tomowiak C, Tanguy-Schmidt A, Lepretre S, Dupuis J, Feugier P, Devidas A, Mariette C,

Leblond V, Thiéblemont C, Validire-Charpy P, Sutton L, Gyan E, et al. Long-term follow-up and second malignancies in 487 patients with hairy cell leukaemia. *Br J Haematol.* 2014; 166: 390–400. doi: 10.1111/bjh.12908.

15. Goodman GR. Extended Follow-Up of Patients With Hairy Cell Leukemia After Treatment With Cladribine. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 891–6. doi: 10.1200/JCO.2003.05.093.

16. Cornet E, Delmer A, Feugier P, Garnache-Ottou F, Ghez D, Leblond V, Levy V, Maloisel F, Re D, Zini J-M, Troussard X. Recommendations of the SFH (French Society of Haematology) for the diagnosis, treatment and follow-up of hairy cell leukaemia. *Ann Hematol.* 2014; 93: 1977–83. doi: 10.1007/s00277-014-2140-y.

17. Hisada M, Chen BE, Jaffe ES, Travis LB. Second Cancer Incidence and Cause-Specific Mortality Among 3104 Patients With Hairy Cell Leukemia: A Population-Based Study. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 215–22. doi: 10.1093/jnci/djk030.

18. Saven A, Burian C, Koziol JA, Piro LD. Long-term follow-up of patients with hairy cell leukemia after cladribine treatment. *Blood.* 1998; 92: 1918–1926.

19. Kampmeier P, Spielberger R, Dickstein J, Mick R, Golomb H, Vardiman JW. Increased incidence of second neoplasms in patients treated with interferon alpha 2b for hairy cell leukemia: a clinicopathologic assessment [see comments]. *Blood.* 1994; 83: 2931–2938.

20. Spaenij-Dekking EHA, Van der Meijden ED, Falkenburg JHF, Kluin-Nelemans JC. Clonally expanded T cells in hairy cell leukemia patients are not leukemia specific. *Leukemia.* 2004; 18: 176–8. doi: 10.1038/sj.leu.2403149.

21. Verma V, Giri S, Bhatt VR, Amador-Ortiz C, Armitage JO. Synchronous or Metachronous Hairy Cell Leukemia and Chronic Lymphocytic Leukemia: A Case Series and Literature Review. *Front Oncol [Internet].* 2017 [cited 2017 Feb 12]; 6. doi: 10.3389/fonc.2016.00270.

22. Basso K, Liso A, Tiacci E, Benedetti R, Pulsoni A, Foa R, Di Raimondo F, Ambrosetti A, Califano A, Klein U, others. Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors. *J Exp Med.* 2004; 199: 59–68.

23. Forconi F, Raspadori D, Lenoci M, Lauria F. Absence of surface CD27 distinguishes hairy cell leukemia from other leukemic B-cell malignancies. *Haematologica.* 2005; 90: 266–268.

24. Weston-Bell N, Townsend M, Di Genova G, Forconi F, Sahota SS. Defining origins of malignant B cells: a new circulating normal human IgM+ D+ B-cell subset lacking CD27 expression and displaying somatically mutated IGHV genes as a relevant memory population. *Leukemia.* 2009; 23: 2075–2080.

25. Fecteau JF, Cote G, Neron S. A New Memory CD27-IgG+ B Cell Population in Peripheral Blood Expressing VH Genes with Low Frequency of Somatic Mutation. *J Immunol.* 2006; 177: 3728–36. doi: 10.4049/jimmunol.177.6.3728.

26. Chung SS, Kim E, Park JH, Chung YR, Lito P, Teruya-Feldstein J, Hu W, Beguelin W, Monette S, Duy C, others. Hematopoietic stem cell origin of BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 238ra71–238ra71.
27. Michonneau D, Kaltenbach S, Derrieux C, Trinquand A, Brouzes C, Gibault L, North M-O, Delarue R, Varet B, Emile J-F, others. BRAFV600E mutation in a histiocytic sarcoma arising from hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*. 2014; 32: e117–e121.
28. Nicolaou F. CD11c gene expression in hairy cell leukemia is dependent upon activation of the proto-oncogenes ras and junD. *Blood*. 2003; 101: 4033–41. doi: 10.1182/blood-2002-01-0324.
29. Kamiguti AS, Harris RJ, Slupsky JR, Baker PK, Cawley JC, Zuzel M. Regulation of hairy-cell survival through constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene*. 2003; 22: 2272–84. doi: 10.1038/sj.onc.1206398.
30. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, Pucciarini A, Bigerna B, Pacini R, Wells VA, others. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011; 364: 2305–2315.
31. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Project CG, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, others. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004; 116: 855–867.
32. Bogusz AM, Bagg A. Genetic aberrations in small B-cell lymphomas and leukemias: molecular pathology, clinical relevance and therapeutic targets. *Leuk Lymphoma*. 2016; 57: 1991–2013. doi: 10.3109/10428194.2016.1173212.
33. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75: 50–83. doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
34. Jain P, Pemmaraju N, Ravandi F. Update on the Biology and Treatment Options for Hairy Cell Leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2014; 15: 187–209. doi: 10.1007/s11864-014-0285-5.
35. Chaigne-Delalande B, Deuve L, Reuzeau E, Basoni C, Lafarge D, Varon C, Tatin F, Anies G, Garand R, Kramer I, Génot E. RhoGTPases and p53 Are Involved in the Morphological Appearance and Interferon- α Response of Hairy Cells. *Am J Pathol*. 2006; 168: 562–73. doi: 10.2353/ajpath.2006.050345.
36. Wong S, Fulcher D. Chemokine Receptor Expression in B-cell Lymphoproliferative Disorders. *Leuk Lymphoma*. 2004; 45: 2491–6. doi: 10.1080/10428190410001723449.
37. Shibayama H, Anzai N, Ritchie A, Zhang S, Mantel C, Broxmeyer HE. Interleukin-3 and Flt3-Ligand Induce Adhesion of Baf3/Flt3 Precursor B-Lymphoid Cells to Fibronectin via Activation of VLA-4 and VLA-5. *Cell Immunol*. 1998; 187: 27–33. doi: 10.1006/cimm.1998.1318.
38. Burthem J, Baker PK, Hunt JA, Cawley JC. Hairy cell interactions with extracellular matrix: expression

of specific integrin receptors and their role in the cell's response to specific adhesive proteins. *Blood*. 1994; 84: 873–882.

39. Vincent AM, Burthem J, Brew R, Cawley JC. Endothelial interactions of hairy cells: the importance of alpha 4 beta 1 in the unusual tissue distribution of the disorder. *Blood*. 1996; 88: 3945–3952.

40. Cawley JC, Hawkins SF. The biology of hairy-cell leukaemia: *Curr Opin Hematol*. 2010; 17: 341–9. doi: 10.1097/MOH.0b013e328338c417.

41. Sivina M, Kreitman RJ, Arons E, Ravandi F, Burger JA. The bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) blocks hairy cell leukaemia survival, proliferation and B cell receptor signalling: a new therapeutic approach. *Br J Haematol*. 2014; 166: 177–88. doi: 10.1111/bjh.12867.

42. Tiacci E, Liso A, Piris M, Falini B. Evolving concepts in the pathogenesis of hairy-cell leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 437–48. doi: 10.1038/nrc1888.

43. Aziz KA, Till KJ, Zuzel M, Cawley JC. Involvement of CD44-hyaluronan interaction in malignant cell homing and fibronectin synthesis in hairy cell leukemia. *Blood*. 2000; 96: 3161–3167.

44. Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Hubmann R, Duechler M, Gisslinger H. TGF- β 1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. *J Clin Invest*. 2004; 113: 676–85. doi: 10.1172/JCI19540.

45. Garnache Ottou F, Chandesris M-O, Lhermitte L, Callens C, Beldjord K, Garrido M, Bedin A-S, Brouzes C, Villemant S, Rubio M-T, Belanger C, Suarez F, Deau B, et al. Peripheral blood 8 colour flow cytometry monitoring of hairy cell leukaemia allows detection of high-risk patients. *Br J Haematol*. 2014; 166: 50–9. doi: 10.1111/bjh.12839.

46. Meyaard L. The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *J Leukoc Biol*. 2008; 83: 799–803. doi: 10.1189/jlb.0907609.

47. Limon JJ, Fruman DA. Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. *Front Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2017 Nov 19]; 3. doi: 10.3389/fimmu.2012.00228.

48. Weichhart T, Hengstschläger M, Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 599–614. doi: 10.1038/nri3901.

49. Nagel S, Ehrentraut S, Meyer C, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RAF. NF κ B is activated by multiple mechanisms in hairy cell leukemia: NF κ B IS Activated by Multiple Mechanisms. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015; 54: 418–32. doi: 10.1002/gcc.22253.

50. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 251–62. doi: 10.1038/nrc1589.

51. Forconi F, Sozzi E, Cencini E, Zaja F, Intermesoli T, Stelitano C, Rigacci L, Gherlinzoni F, Cantaffa R,

Baraldi A, Gallamini A, Zaccaria A, Pulsoni A, et al. Hairy cell leukemias with unmutated IGHV genes define the minor subset refractory to single-agent cladribine and with more aggressive behavior. *Blood*. 2009; 114: 4696–702. doi: 10.1182/blood-2009-03-212449.

52. Sambani C, Trafalis DT, Mitsoulis-Mentzikoff C, Poulakidas E, Makropoulos V, Pantelias GE, Mecucci C. Clonal chromosome rearrangements in hairy cell leukemia: personal experience and review of literature. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001; 129: 138–144.

53. Ueshima Y, Alimena G, Rowley JD, Golomb HM. Cytogenetic studies in patients with hairy cell leukemia. *Hematol Oncol*. 1983; 1: 215–226.

54. Hockley SL, Morgan GJ, Leone PE, Walker BA, Morilla A, Else M, Wotherspoon A, Dearden C, Catovsky D, Gonzalez D, others. High-resolution genomic profiling in hairy cell leukemia-variant compared with typical hairy cell leukemia. *Leukemia*. 2011; 25: 1189–1192.

55. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri stefano A, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon; 2008.

56. Tiacci E, Pettrossi V, Schiavoni G, Falini B. Genomics of Hairy Cell Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017; 35: 1002–10. doi: 10.1200/JCO.2016.71.1556.

57. Xi L, Arons E, Navarro W, Calvo KR, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Kreitman RJ. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. *Blood*. 2012; 119: 3330–3332.

58. Waterfall JJ, Arons E, Walker RL, Pineda M, Roth L, Killian JK, Abaan OD, Davis SR, Kreitman RJ, Meltzer PS. High prevalence of MAP2K1 mutations in variant and IGHV4-34-expressing hairy-cell leukemias. *Nat Genet*. 2013; 46: 8–10. doi: 10.1038/ng.2828.

59. Weston-Bell NJ, Tapper W, Gibson J, Bryant D, Moreno Y, John M, Ennis S, Kluin-Nelemans HC, Collins AR, Sahota SS. Exome Sequencing in Classic Hairy Cell Leukaemia Reveals Widespread Variation in Acquired Somatic Mutations between Individual Tumours Apart from the Signature BRAF V(600)E Lesion. Richards KL, editor. *PLOS ONE*. 2016; 11: e0149162. doi: 10.1371/journal.pone.0149162.

60. Dietrich S, Hüllein J, Lee SC-W, Hutter B, Gonzalez D, Jayne S, Dyer MJ, Oleś M, Else M, Liu X, others. Recurrent CDKN1B (p27) mutations in hairy cell leukemia. *Blood*. 2015; 126: 1005–1008.

61. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013; 499: 214–8. doi: 10.1038/nature12213.

62. Camus V, Miloudi H, Taly A, Sola B, Jardin F. XPO1 in B cell hematological malignancies: from recurrent somatic mutations to targeted therapy. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 5]; 10. doi: 10.1186/s13045-017-0412-4.

63. Jallades L, Baseggio L, Sujobert P, Huet S, Chabane K, Callet-Bauchu E, Verney A, Hayette S, Desvignes J-P, Salgado D, Levy N, Bérout C, Felman P, et al. Exome sequencing identifies recurrent BCOR gene alterations and the absence of KLF2, TNFAIP3 and MYD88 mutations in splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2017; : 1758–66. doi: 10.3324/haematol.2016.160192.
64. Pettirossi V, Santi A, Imperi E, Russo G, Pucciarini A, Bigerna B, Schiavoni G, Fortini E, Spanhol-Rosseto A, Sportoletti P, others. BRAF inhibitors reverse the unique molecular signature and phenotype of hairy cell leukemia and exert potent antileukemic activity. *Blood*. 2015; 125: 1207–1216.
65. Tiacci E, Park JH, De Carolis L, Chung SS, Broccoli A, Scott S, Zaja F, Devlin S, Pulsoni A, Chung YR, Cimminiello M, Kim E, Rossi D, et al. Targeting Mutant BRAF in Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia. *N Engl J Med*. 2015; 373: 1733–47. doi: 10.1056/NEJMoa1506583.
66. Wotherspoon A, Attygalle A, Sena Teixeira Mendes L. Bone marrow and splenic histology in hairy cell leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015; 28: 200–7. doi: 10.1016/j.beha.2015.10.019.
67. Sherman MJ, Hanson CA, Hoyer JD. An Assessment of the Usefulness of Immunohistochemical Stains in the Diagnosis of Hairy Cell Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2011; 136: 390–9. doi: 10.1309/AJCP5GE1PSBMBZTW.
68. Sharpe RW, Bethel KJ. Hairy Cell Leukemia: Diagnostic Pathology. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2006; 20: 1023–49. doi: 10.1016/j.hoc.2006.06.010.
69. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houliham H, Meeus P, Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma*. 1994; 14: 57–61.
70. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Marco JG, Houliham A, Que TH, Catovsky D. The Immunological Profile of B-Cell Disorders and Proposal of a Scoring System for the Diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994; 8: 1640–5.
71. Venkataraman G, Aguhar C, Kreitman RJ, Yuan CM, Stetler-Stevenson M. Characteristic CD103 and CD123 Expression Pattern Defines Hairy Cell Leukemia: Usefulness of CD123 and CD103 in the Diagnosis of Mature B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Am J Clin Pathol*. 2011; 136: 625–30. doi: 10.1309/AJCPKUM9J4IXCWEU.
72. Del Giudice I, Matutes E, Morilla R, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Rafiq F, A'Hern R, Delgado J, Bazerbashi MB, Catovsky D. The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *haematologica*. 2004; 89: 303–308.
73. Favre R, Manzoni D, Traverse-Glehen A, Verney A, Jallades L, Callet-Bauchu E, Sujobert P, Salles G, Baseggio L. Usefulness of CD200 in the differential diagnosis of SDRPL, SMZL, and HCL. *Int J Lab Hematol [Internet]*. 2018 [cited 2018 May 8]; . doi: 10.1111/ijlh.12824.

74. Jain D, Dorwal P, Gajendra S, Pande A, Mehra S, Sachdev R. CD5 positive hairy cell leukemia: A rare case report with brief review of literature. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016; 90: 467–72. doi: 10.1002/cyto.b.21365.
75. Robbins BA, Ellison DJ, Spinosa JC, Carey CA, Lukes RJ, Poppema S, Saven A, Piro LD. Diagnostic application of two-color flow cytometry in 161 cases of hairy cell leukemia. *Blood.* 1993; 82: 1277–1287.
76. Jasionowski TM, Hartung L, Greenwood JH, Perkins SL, Bahler DW. Analysis of CD10+ Hairy Cell Leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2003; 120: 228–35. doi: 10.1309/QVJD31TEG9UJ18BQ.
77. Juliusson G, Lenkei R, Liliemark J. Flow cytometry of blood and bone marrow cells from patients with hairy cell leukemia: phenotype of hairy cells and lymphocyte subsets after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood.* 1994; 83: 3672–3681.
78. Poret N, Fu Q, Guihard S, Cheok M, Miller K, Zeng G, Quesnel B, Troussard X, Galiegue-Zouitina S, Shelley CS. CD38 in Hairy Cell Leukemia Is a Marker of Poor Prognosis and a New Target for Therapy. *Cancer Res.* 2015; 75: 3902–11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0893.
79. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, Ambrosetti A, Cecchini D, Sozzi E, Francia di Celle P, Di Bello C, Pulsoni A, Foa R, Inghirami G, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood.* 2012; 119: 192–5. doi: 10.1182/blood-2011-08-371179.
80. Greaves WO, Verma S, Patel KP, Davies MA, Barkoh BA, Galbincea JM, Yao H, Lazar AJ, Aldape KD, Medeiros LJ, others. Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma. *J Mol Diagn.* 2013; 15: 220–226.
81. Badalian-Very G, Vergilio J-A, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, Kuo FC, Ligon AH, Stevenson KE, Kehoe SM, Garraway LA, Hahn WC, Meyerson M, et al. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2010; 116: 1919–23. doi: 10.1182/blood-2010-04-279083.
82. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, Harview CL, Brunet J-P, Ahmann GJ, Adli M, Anderson KC, Ardlie KG, Auclair D, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature.* 2011; 471: 467–72. doi: 10.1038/nature09837.
83. Tschernitz S, Flossbach L, Bonengel M, Roth S, Rosenwald A, Geissinger E. Alternative BRAF mutations in BRAF V600E-negative hairy cell leukaemias. *Br J Haematol.* 2014; 165: 529–33. doi: 10.1111/bjh.12735.
84. Arons E, Roth L, Sapolsky J, Suntum T, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. Evidence of canonical somatic hypermutation in hairy cell leukemia. *Blood.* 2011; 117: 4844–4851. doi: 10.1182/blood-2010-11-316737.
85. Grever MR, Abdel-Wahab O, Andritsos LA, Banerji V, Barrientos J, Blachly JS, Call TG, Catovsky D, Dearden C, Demeter J, others. Consensus guidelines for the diagnosis and management of patients with classic hairy cell leukemia. *Blood.* 2017; 129: 553–560.

86. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5: 355–66. doi: 10.1038/nrm1365.
87. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002; 2: 103–12. doi: 10.1016/S1535-6108(02)00102-2.
88. König EA, Kusser WC, Day C, Porzsolt F, Glickman BW, Messer G, Schmid M, De Chatel R, Marcsek ZL, Demeter J. p53 mutations in hairy cell leukemia. *Leukemia.* 2000; 14: 706–11.
89. Vallianatou K, Brito-Babapulle V, Matutes E, Atkinson S, Catovsky D. p53 gene deletion and trisomy 12 in hairy cell leukemia and its variant. *Leuk Res.* 1999; 23: 1041–1045.
90. Zenz T, Benner A, Döhner H, Stilgenbauer S. Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer: The role of the p53 pathway. *Cell Cycle.* 2008; 7: 3810–4. doi: 10.4161/cc.7.24.7245.
91. Durham BH, Getta B, Dietrich S, Taylor J, Won H, Bogenberger JM, Scott S, Kim E, Chung YR, Chung SS, others. Genomic analysis of hairy cell leukemia identifies novel recurrent genetic alterations. *Blood.* 2017; 130: 1644–8.
92. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, others. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016; 127: 2375–90.
93. Curiel-Olmo S, Mondéjar R, Almaraz C, Mollejo M, Cereceda L, Marès R, Derdak S, Campos-Martin Y, Batlle A, Gonzalez de Villambrosia S, Gut M, Blanc J, Traverse-Glehen A, et al. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma displays increased expression of cyclin D3 and recurrent CCND3 mutations. *Blood.* 2017; 129: 1042–5.
94. Hockley SL, Giannouli S, Morilla A, Wotherspoon A, Morgan GJ, Matutes E, Gonzalez D. Insight into the molecular pathogenesis of hairy cell leukaemia, hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma, provided by the analysis of their IGH rearrangements and somatic hypermutation patterns. *Br J Haematol.* 2010; 148: 665–6. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07962.x.
95. Kanellis G, Mollejo M, Montes-Moreno S, Rodriguez-Pinilla S-M, Cigudosa JC, Algara P, Montalban C, Matutes E, Wotherspoon A, Piris MA. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica.* 2010; 95: 1122–9. doi: 10.3324/haematol.2009.013714.
96. Matutes E, Martínez-Trillos A, Campo E. Hairy cell leukaemia-variant: Disease features and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015; 28: 253–63. doi: 10.1016/j.beha.2015.09.002.
97. Salido M, Baro C, Oscier D, Stamatopoulos K, Dierlamm J, Matutes E, Traverse-Glehen A, Berger F, Felman P, Thieblemont C, Gesk S, Athanasiadou A, Davis Z, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell

Lymphoma Group. *Blood*. 2010; 116: 1479–88. doi: 10.1182/blood-2010-02-267476.

98. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Callet-Bauchu E, Morel D, Gazzo S, Ffrench M, Verney A, Rolland D, Thieblemont C, Magaud J-P, others. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood*. 2008; 111: 2253–2260. doi: 10.1182/blood-2007-07-098848.

99. Clipson A, Wang M, de Leval L, Ashton-Key M, Wotherspoon A, Vassiliou G, Bolli N, Grove C, Moody S, Escudero-Ibarz L, Gundem G, Brugger K, Xue X, et al. KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia*. 2015; 29: 1177–85. doi: 10.1038/leu.2014.330.

100. Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, Zhao L, Weigelin HG, Chiang MY, Huebner-Chan DR, Bailey NG, Yang DT, Bhagat G, Miranda RN, Bahler DW, Medeiros LJ, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic *NOTCH2* mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med*. 2012; 209: 1553–65. doi: 10.1084/jem.20120910.

101. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Bruscazzin A, Rasi S, Spina V, Monti S, Vaisitti T, Arruga F, Famà R, Ciardullo C, Greco M, Cresta S, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of *NOTCH2* and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med*. 2012; 209: 1537–51. doi: 10.1084/jem.20120904.

102. Baliakas P, Strefford JC, Bikos V, Parry M, Stamatopoulos K, Oscier D. Splenic marginal-zone lymphoma: ontogeny and genetics. *Leuk Lymphoma*. 2015; 56: 301–10. doi: 10.3109/10428194.2014.919636.

103. Traverse-Glehen A, Verney A, Gazzo S, Jallades L, Chabane K, Hayette S, Coiffier B, Callet-Bauchu E, Ffrench M, Felman P, Berger F, Baseggio L, Salles G. Splenic diffuse red pulp lymphoma has a distinct pattern of somatic mutations amongst B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2016; : 1–10. doi: 10.1080/10428194.2016.1196813.

104. Else M, Dearden CE, Catovsky D. Long-term follow-up after purine analogue therapy in hairy cell leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015; 28: 217–29. doi: 10.1016/j.beha.2015.09.004.

105. Grever MR. How I treat hairy cell leukemia. *Blood*. 2010; 115: 21–8. doi: 10.1182/blood-2009-06-195370.

106. Robak T, Matutes E, Catovsky D, Zinzani PL, Buske C. Hairy cell leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015; 26: v100–7. doi: 10.1093/annonc/mdv200.

107. Thompson PA, Ravandi F. How I manage patients with hairy cell leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Feb 12]; . doi: 10.1111/bjh.14524.

108. Vergote V, Dierickx D, Janssens A, Verhoef G, Tousseyn T, Vandenberghe P, Wolter P,

Delforge M. Rapid and complete hematological response of refractory hairy cell leukemia to the BRAF inhibitor dabrafenib. *Ann Hematol.* 2014; 93: 2087–9. doi: 10.1007/s00277-014-2104-2.

109. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, Kudchadkar R, Burris HA, Falchook G, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med.* 2012; 367: 1694–703. doi: 10.1056/NEJMoa1210093.

110. Kreitman RJ, Tallman MS, Robak T, Coutre S, Wilson WH, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Lechleider R, Pastan I. Phase I Trial of Anti-CD22 Recombinant Immunotoxin Moxetumomab Pasudotox (CAT-8015 or HA22) in Patients With Hairy Cell Leukemia. *J Clin Oncol.* 2012; 30: 1822–8. doi: 10.1200/JCO.2011.38.1756.

111. Getta BM, Park JH, Tallman MS. Hairy cell leukemia: Past, present and future. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015; 28: 269–72. doi: 10.1016/j.beha.2015.10.015.

112. Dubois S, Viailly P-J, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, Maingonnat C, Jais J-P, Peyrouze P, Figeac M, Molina TJ, Desmots F, Fest T, et al. Next Generation Sequencing in Diffuse Large B Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin Cancer Res [Internet].* 2016 [cited 2016 Mar 26]; . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2305.

113. Colecchia D, Rossi M, Sasdelli F, Sanzone S, Strambi A, Chiariello M. MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. *Autophagy.* 2015; 11: 1790–802. doi: 10.1080/15548627.2015.1084454.

114. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science.* 2004; 306: 269–71. doi: 10.1126/science.1102160.

115. Bigas A, Robert-Moreno lex, Espinosa L. The Notch pathway in the developing hematopoietic system. *Int J Dev Biol.* 2010; 54: 1175–88. doi: 10.1387/ijdb.093049ab.

116. Manel E. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med.* 2008; : 12.

117. Jardin F, Pujals A, Pelletier L, Bohers E, Camus V, Mareschal S, Dubois S, Sola B, Ochmann M, Lemonnier F, Viailly P-J, Bertrand P, Maingonnat C, et al. Recurrent mutations of the exportin 1 gene (XPO1) and their impact on selective inhibitor of nuclear export compounds sensitivity in primary mediastinal B-cell lymphoma: XPO1 Mutations in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma. *Am J Hematol.* 2016; 91: 923–30. doi: 10.1002/ajh.24451.

118. Cosson A, Chapiro E, Bougacha N, Lambert J, Herbi L, Cung H-A, Algrin C, Keren B, Damm F, Gabillaud C, Brunelle-Navas M-N, Davi F, Merle-Béral H, et al. Gain in the short arm of chromosome 2 (2p+) induces gene overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of the central role of XPO1. *Leukemia [Internet].* 2017 [cited 2017 Mar 29]; . doi: 10.1038/leu.2017.100.

119. Albrecht C, Viturro E. The ABCA subfamily—gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 2007; 453: 581–9. doi: 10.1007/s00424-006-0047-8.
120. Piva R, Deaglio S, Famà R, Buonincontri R, Scarfò I, Brusca A, Mereu E, Serra S, Spina V, Brusa D, Garaffo G, Monti S, Dal Bo M, et al. The Krüppel-like factor 2 transcription factor gene is recurrently mutated in splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia.* 2015; 29: 503–7. doi: 10.1038/leu.2014.294.
121. Nayak L, Goduni L, Takami Y, Sharma N, Kapil P, Jain MK, Mahabeleshwar GH. Kruppel-Like Factor 2 Is a Transcriptional Regulator of Chronic and Acute Inflammation. *Am J Pathol.* 2013; 182: 1669–704. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.029>.
122. Jebaraj BMC, Kienle D, Bühler A, Winkler D, Döhner H, Stilgenbauer S, Zenz T. *BRAF* mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2013; 54: 1177–82. doi: 10.3109/10428194.2012.742525.
123. Tiacci E, Pucciarini A, Bigerna B, Pettrossi V, Strozzi F, Martelli MP, Tabarrini A, Drexler HG, Falini B. Absence of *BRAF*-V600E in the human cell lines BONNA-12, ESKOL, HAIR-M, and HC-1 questions their origin from hairy cell leukemia. *Blood.* 2012; 119: 5332–5333.
124. Wientjens G-JH, Jansen JH, Wessels HW, Kibbelaar RE, Beverstock GC, Brederoo P, Kluin-nelemans HC. Characterization of a new human B cell line (Bonna-12) with trisomy 9 and trisomy 12 chromosomal abnormality. *Leuk Lymphoma.* 1991; 5: 415–422.
125. Anderson LC, Gahmberg CG, Jansson SE, Vuopio P, Lehtonen E. Establishment and characterization of a hairy cell leukemia cell line, JOK-1. *Leuk Markers.* 1981; : 297–300.
126. Yao Z, Torres NM, Tao A, Gao Y, Luo L, Li Q, de Stanchina E, Abdel-Wahab O, Solit DB, Poulikakos PI, Rosen N. *BRAF* Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition. *Cancer Cell.* 2015; 28: 370–83. doi: 10.1016/j.ccell.2015.08.001.
127. Hart GT, Wang X, Hogquist KA, Jameson SC. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates B-cell reactivity, subset differentiation, and trafficking molecule expression. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108: 716–21. doi: 10.1073/pnas.1013168108.
128. Winkelmann R, Sandrock L, Porstner M, Roth E, Mathews M, Hobeika E, Reth M, Kahn ML, Schuh W, Jack H-M. B cell homeostasis and plasma cell homing controlled by Kruppel-like factor 2. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108: 710–5. doi: 10.1073/pnas.1012858108.
129. Sivina M, Burger JA. The importance of the tissue microenvironment in hairy cell leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015; 28: 208–16. doi: 10.1016/j.beha.2015.09.006.
130. Cortazar JM, DeAngelo DJ, Pinkus GS, Morgan EA. Morphological and immunophenotypical features of hairy cell leukaemia involving lymph nodes and extranodal tissues. *Histopathology.* 2017; 71: 112–24.

doi: 10.1111/his.13206.

131. Bromberg-White JL, Andersen NJ, Duesbery NS. MEK genomics in development and disease. *Brief Funct Genomics*. 2012; 11: 300–10. doi: 10.1093/bfgp/els022.
132. Emery CM, Vijayendrana KG, Zipsere MC, Sawyera AM, Niua L, Kima JJ, Hattona C, Choprad R, Oberholzera PA, Karpovac MB, MacConailla LE, Zhangf J, Grayf NS, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *PNAS*. 2009; 106: 20411–6.
133. Marks JL, Gong Y, Chitale D, Golas B, McLellan MD, Kasai Y, Ding L, Mardis ER, Wilson RK, Solit D, Levine R, Michel K, Thomas RK, et al. Novel MEK1 Mutation Identified by Mutational Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway Genes in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2008; 68: 5524–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0099.
134. van Haaften G, Dalgliesh GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Teague J, Butler A, Hinton J, Latimer C, et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet*. 2009; 41: 521–3. doi: 10.1038/ng.349.
135. Sengoku T, Yokoyama S. Structural basis for histone H3 Lys 27 demethylation by UTX/KDM6A. *Genes Dev*. 2011; 25: 2266–77. doi: 10.1101/gad.172296.111.
136. Dee Ler L, Ghosh S, Chai X, Thike AA, Lee Heng H, Yan Siew E, Dey S, Kai Koh L, Quan Lim J, Khong Lim W, Myint SS, Liang Loh J, Ong P, et al. Loss of tumor suppressor KDM6A amplifies PRC2-regulated transcriptional repression in bladder cancer and can be targeted through inhibition of EZH2. *Sci Transl Med*. 2017; 9.
137. Van der Meulen J, Sanghvi V, Mavrakis K, Durinck K, Fang F, Matthijssens F, Rondou P, Rosen M, Pieters T, Vandenberghe P, others. The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015; 125: 13–21.
138. Schuh A, Becq J, Humphray S, Alexa A, Burns A, Clifford R, Feller SM, Grocock R, Henderson S, Khrebtukova I, Kingsbury Z, Luo S, McBride D, et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*. 2012; 120: 4191–6. doi: 10.1182/blood-2012-05-433540.
139. Camus V, Stamatoullas A, Mareschal S, Viailly P-J, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, Dubois S, Picquenot JM, Ruminy P, Maingonnat C, Bertrand P, Cornic M, Tallon-Simon V, et al. Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma. *Haematologica*. 2016; 101: 1094–101. doi: 10.3324/haematol.2016.145102.
140. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, Alpermann T, Roller A, Kohlmann A, Haferlach T, Kern W, Schnittger S. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2014; 28: 108–17.

doi: 10.1038/leu.2013.263.

141. Tuna M, Knuutila S, Mills GB. Uniparental disomy in cancer. *Trends Mol Med.* 2009; 15: 120–8. doi: 10.1016/j.molmed.2009.01.005.
142. Raghavan M, Smith L-L, Lillington DM, Chaplin T, Kakkas I, Molloy G, Chelala C, Cazier J-B, Cavenagh JD, Fitzgibbon J, Lister TA, Young BD. Segmental uniparental disomy is a commonly acquired genetic event in relapsed acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008; 112: 814–21. doi: 10.1182/blood-2008-01-132431.
143. Jin D-H, Lee J, Kim KM, Kim S, Kim D-H, Park J. Overexpression of MAPK15 in gastric cancer is associated with copy number gain and contributes to the stability of c-Jun. *Oncotarget.* 2015; 6: 20190.
144. Iavarone C, Acunzo M, Carlomagno F, Catania A, Melillo RM, Carlomagno SM, Santoro M, Chiariello M. Activation of the Erk8 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase by RET/PTC3, a Constitutively Active Form of the RET Proto-oncogene. *J Biol Chem.* 2006; 281: 10567–76. doi: 10.1074/jbc.M513397200.
145. Curiel-Olmo S, Mondéjar R, Almaraz C, Mollejo M, Cereceda L, Marès R, Derdak S, Campos-Martín Y, Batlle A, González de Villambrosía S, Gut M, Blanc J, Traverse-Glehen A, et al. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma displays increased expression of cyclin D3 and recurrent CCND3 mutations. *Blood.* 2017; 129: 1042–5. doi: 10.1182/blood-2016-11-751024.



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.