HAL
open science

Effets fonctionnels des mutations de KDM6A dans la leucémie à tricholeucocytes

Margaux Wiber

To cite this version:

Margaux Wiber. Effets fonctionnels des mutations de KDM6A dans la leucémie à tricholeucocytes. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03077527

HAL Id: dumas-03077527

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03077527v1

Submitted on 16 Dec 2020

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

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

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

Préparé au sein de l'Université de Caen Normandie

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

Effets fonctionnels des mutations de *KDM6A* dans la leucémie à tricholeucocytes

Présenté par

Margaux WIBER

Soutenu publiquement le 2 juillet 2020 devant le jury composé de		
Mme Sophie KRIEGER	MCU-PH, Laboratoire de biologie médicale, Centre François Baclesse	Président du jury
M. Vahid ASNAFI	PU-PH, chef de service du laboratoire d'oncohématologie, CHU de Necker	Examinateur
M. Gandhi Laurent DAMAJ	PU-PH, chef de service de l'hématologie clinique, CHU de Caen	Examinateur
Mme Brigitte SOLA	Directeur de recherche, CNRS, équipe INSERM UMR1245	Examinateur
Mme Elsa MAITRE	AHU, laboratoire d'hématologie, CHU de Caen	Examinateur

Mémoire dirigé par le Pr Xavier TROUSSARD, PU-PH, chef de service du laboratoire d'hématologie du CHU de Caen

UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs
Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

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

GIARD Jean-Christophe ..... Bactériologie, Virologie

MALZERT-FREON Aurélie ..... Pharmacie galénique

ROCHAIS 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) **– HDR** ..... 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 – HDR..... Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie ..... Anglais

PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume ..... Pharmacie clinique

SEDILLO Patrick ..... Pharmacie officinale

RICHARD Estelle ..... Pharmacie officinale

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

JOURDAN Jean-Pierre

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

A Madame le Docteur Sophie Krieger,
Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury.

A Monsieur le Professeur Xavier Troussard,
Je vous remercie de m'avoir soutenue depuis le début dans mon projet de spécialisation en oncohématologie, de m'avoir proposé ce sujet de thèse très intéressant et de m'avoir guidé tout au long de ce travail.

A Monsieur le Professeur Vahid Asnafi,
C'est un honneur pour moi que vous ayez accepté d'évaluer mon travail. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire lors de mon semestre d'inter-CHU qui fut très enrichissant. Je vous suis reconnaissante de me permettre de rejoindre votre équipe en novembre prochain et espère me montrer à la hauteur de vos attentes.

A Madame le Docteur Brigitte Sola,
Je te remercie chaleureusement d'avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse qui vient clôturer un travail que j'ai eu grand plaisir à mener au sein de ton équipe de recherche. Je te remercie pour ton accueil, ta disponibilité et tes conseils avisés qui m'ont beaucoup apporté dans la réalisation de ce projet.

A Monsieur le Professeur Gandhi Damaj,
Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans mon jury. C'est un honneur pour moi de vous voir évaluer mon travail.

A Madame le Docteur Elsa Maitre,

Je suis heureuse de te compter parmi mes membres du jury. J'espère que tu garderas un bon souvenir de cette thèse, une de tes premières en tant qu'évaluateur. J'ai pris en tout cas plaisir à échanger avec toi sur les interrogations qui ont pu être soulevées au cours de ce projet et plus généralement sur l'oncohématologie. Je te souhaite le meilleur pour la suite et du courage pour l'aménagement de ta nouvelle maison !

Aux équipes médicales,

A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie du CHU de Caen,

Je vous remercie pour votre accueil au cours des trois, et bientôt quatre, semestres passés parmi vous qui ont renforcés mon intérêt pour l'hématologie. Je tiens à remercier particulièrement les **Docteurs Dina Naguib, Véronique Salaun et Edouard Cornet** qui m'ont fait profiter de leurs connaissances sur la cytologie, l'immunophénotypage et la biologie moléculaire.

A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie du CHU de Necker,

Je remercie toute l'équipe médicale, **Chantal, Eugénie, Chrystelle** et **Ludovic,** et technique pour son accueil au cours de ce semestre d'inter-CHU qui fut très enrichissant. Je remercie **Marie-Emilie**, **Mehdi** et **Mélanie** pour leur soutien au cours de la réalisation de mon petit projet de recherche. Ce sera un plaisir de vous retrouver en novembre.

A toute l'équipe du laboratoire de recherche MICAH,

Merci **Hadjer** pour ta bonne humeur et ta disponibilité. Merci de m'avoir fait profiter de ton expertise précieuse sur la transfection et le CRISPR-Cas9. J'espère te retrouver à Paris en novembre prochain pour partager encore de bons moments avec toi.

Merci **Anne** de m'avoir initier aux mystères du Western-blot et pour ta gentillesse. Je te souhaite de profiter pleinement de ta retraite.

A mes co-internes caennais,

Ce fut un plaisir de faire votre connaissance et de travailler avec vous. A **Justine**, une compatriote angevine, merci pour tous ces moments partagés en stage et en dehors. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ton petit Mathis et Thomas et de t'épanouir dans tes nouvelles fonctions de virologue. A **Clémentine**, merci pour ta gentillesse, les discussions à la piscine et d'avoir accepté de garder Kiara de temps à autres. A **Flavie**, merci également pour ta gentillesse et tous les bons moments passés ensemble. J'espère qu'il y en aura d'autres. A **Claire**, **Olla** et **Valérie**, avec qui j'ai également partagé de bons moments en stage, en master 2 ou en DU.

A mes co-internes parisiens,

Sara, Marie, Sofiane et Charlyne, j'ai passé un très bon semestre parisien grâce à vous et ce malgré la combinaison grève des transports et coronavirus qui a limité le interactions sociales et ne m'a pas permis de profiter pleinement de la vie parisienne ! Je suis contente d'avoir l'occasion de rattraper cela en novembre prochain et de travailler de nouveau à tes côtés **Sara**.

A mes amies de la faculté de Pharmacie de Caen,

Pauline, **Mathilde**, **Marie**, **Marion**, **Anne-Lise**, **Apolline**, **Camille** et **Mylène**, merci d'avoir contribuer à rendre ces années pharma inoubliables ! Je suis heureuse d'avoir pu garder contact avec la plupart d'entre vous malgré l'éloignement géographique. C'est toujours un plaisir de vous retrouver. **Pauline** et **Marie**, je repense encore à nos soirées révision pour l'internat qui ont contribué à ma réussite et, j'espère, à la vôtre !

Enfin, je voudrais remercier ma famille,

A mes parents, Sophie et Alain et à mon frère, Hugo. Merci pour votre soutien sans faille, de n'avoir cessé de croire en moi et de m'avoir poussé toujours plus haut. Je suis toujours heureuse de vous retrouver.

A **Sylvain**, je suis heureuse de partager ma vie avec toi. Merci pour ton soutien et tous les bons moments passés ensemble.

UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

TABLE DES MATIERES

1. Introduction 1
1.1. La leucémie à tricholeucocytes 1
1.1.1. Epidémiologie 1
1.1.2. Clinique 2
1.1.3. Diagnostic biologique 2
1.1.4. Physiopathologie 5
1.1.1. Prise en charge thérapeutique 11
1.1.2. Autres proliférations à cellules chevelues 15
1.2. KDM6A, une protéine de l'épigénétique 17
1.2.1. Epigénétique et leucémie à tricholeucocytes 17
1.2.2. KDM6A et leucémie à tricholeucocytes 20
1.2.3. KDM6A, un gène suppresseur de tumeur ? 24
1.2.4. Perspectives thérapeutiques 26
1.3. Objectifs 29
2. Matériels et méthodes 30
2.1. Lignées cellulaires 30
2.2. Culture cellulaire 33
2.3. Modification génétique des cellules 33
2.3.1. Construction du système CRISPR-Cas9 33
2.3.2. Transfection par électroporation 36
2.3.3. Surveyor® Nuclease Assay 37
2.3.4. Technique d'analyse de fragments 39
2.3.5. Séquençage à haut débit 39
2.3.6. Clonage 40
2.4. Analyses fonctionnelles 41
2.4.1. Prolifération cellulaire 41
2.4.2. Adhérence à la fibronectine 41
2.4.3. Test MTS 41
2.5. Cytométrie en flux 43
2.6. Immunoblot 44

3. Résultats 47
3.1. Transfection 47
3.1.1. Lignée JVM-3 47
3.1.2. Lignée BONNA-12 48
3.1.3. Lignée CM 49
3.2. Analyse génétique 50
3.3. Clonage 53
3.4. La perte d'expression de KDM6A promeut l'activation de la voie des MAP-kinases et l'expression de la survivine associées à une meilleure résistance des cellules en milieu pauvre en nutriments 53
3.5. La perte d'expression de KDM6A entraine une modulation de l'expression des marqueurs CD123, CD23, CD79b et CD11c 57
3.6. La perte d'expression de KDM6A ne module pas la sensibilité aux chimiothérapies et thérapies ciblées 60
4. Discussion 62
5. Conclusion 72
Annexes 87
Annexe 1 : Fréquence des variants génétiques d'intérêt dans la leucémie à tricholeucocytes et sa forme variante dans les études de séquençage à haut débit 89
Annexe 2 : Protocole de transfection avec la technologie Nucleofector™ 90
Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit Macherey-Nagel NucleoSpin® 91
Annexe 4 : Séquence cible du système CRISPR-Cas9 dans l'exon 4 de *KDM6A* et amorces utilisées pour le Surveyor® Nuclease Assay 92

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARID1A/1B : *AT-rich interactive domain 1A/1B*

ARN : Acide Ribonucléique

BCR : Récepteur des cellules B

BET : *Bromodomain and Extra Terminal*

BETi : Inhibiteurs de protéines BET

BRAFi : Inhibiteur de BRAF

BTK : Tyrosine kinase de Bruton

CDK : *Cyclin Dependent Kinase*

COMPASS : Complexe de Protéines Associées à SET1

COSMIC : Catalogue of Somatic Mutations in Cancer

CpG : Cytosine-phosphate-Guanine

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9*

crRNA : *CRISPR RNA*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNMT : Méthyltransférases de l'ADN

EBNA-2 : Antigène Nucléaire de l'EBV 2

EBV : virus d'Epstein-Barr

ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase*

EZH2 : *Enhancer of Zest Homolog 2*

GDP : Guanosine Diphosphate

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GRB2 : *Growth factor receptor-bound protein 2*

GTP : Guanosine Triphosphate

H3K27 : Lysine 27 de l'histone H3

H3K4 : Lysine 4 de l'histone H3

HCL : Leucémie à tricholeucocytes (*Hairy Cell Leukemia*)

HCL-v : Forme variante de la leucémie à tricholeucocytes (*Variant form of Hairy cell leukemia*)

HDAC : Histone Désacétylase

HDACi : Inhibiteur d'Histone Désacétylase

HDR : *Homology directed repair*

IGV : *Integrative Genomics Viewer*

IL-3/4 : Interleukine 3/4

IκB : *Inhibitor of κB*

JmJC : Domaine Jumonji C

KDM6A : Lysine déméthylase 6A

KMT : Lysine méthyltransférases

LAL : Leucémie Aigüe Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinases*

MeCP2 : *Methyl CpG binding Protein 2*

MEK : *Mitogen activated protein/Extracellular signal-regulated Kinase*

MEKi : Inhibiteur de MEK

MM : Myélome multiple

mTOR : *mammalian target of rapamycin*

NF-κB : *Nuclear factor κB*

NHEJ : *Non-Homologous End-Joining*

PAM : *Protospacer adjacent-motif*

Pb : Paires de bases

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaine

PGM : *Personal Genome Machine*

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase

PNA : Analogue de Purine

PRC1/2 : Polycomb Repressive Complex 1/2

PTIP : *Pax transactivation domain-interacting protein*

RC : Réponse Complète

rVAF : ratio de fréquence allélique

SDRPL : Lymphome diffus de la pulpe rouge splénique

SDS : Solution de Dodécylsulfate de Sodium

sgRNA : ARN guide simple brin

SMZL : Lymphome de la zone marginale splénique

ssODN : Oligonucléotide simple brin donneur de correction

SVF : Sérum de Veau Fœtal

SWI/SNF : *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*

TPR : Répétition Tétratricopeptide

tracrRNA : *Trans-activating CRISPR RNA*

UTY/X : *Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromosome Y/X*

Zn binding : domaine de liaison au zinc

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAU 1 DIAGNOSTICS DIFFERENTIELS DE LA LEUCEMIE A TRICHOLEUCOCYTES 16

TABLEAU 2 LISTE DES REACTIFS UTILISES POUR LA PCR ET L'ANALYSE DES PRODUITS DE PCR 39

TABLEAU 3 MOLECULES THERAPEUTIQUES TESTEES AVEC LEUR GAMME DE CONCENTRATIONS 42

TABLEAU 4 LISTE DES ANTICORPS UTILISES POUR L'ANALYSE DE CYTOMETRIE EN FLUX 44

TABLEAU 5 COMPOSANTS DU TAMPON D'EXTRACTION RIPA 45

TABLEAU 6 ANTICORPS UTILISES POUR LES IMMUNOBLOTS 46

FIGURE 1 TRICHOLEUCOCYTES DANS LE SANG PERIPHERIQUE 3

FIGURE 2 COEXPRESSION DES MARQUEURS CD103, CD123, CD25 ET CD11C SUR LES TRICHOLEUCOCYTES 4

FIGURE 3 INTERACTIONS DES TRICHOLEUCOCYTES AVEC LE MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE (55) 11

FIGURE 4 CIBLES THERAPEUTIQUES AU SEIN DES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE IMPLIQUEES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA LEUCEMIE A TRICHOLEUCOCYTES ET/OU SA FORME VARIANTE 14

FIGURE 5 PROCESSUS DE REGULATION DE LA CHROMATINE (72) 18

FIGURE 6 REPRESENTATION DES VARIANTS RETROUVES DANS *KDM6A* 22

FIGURE 7 REGULATION EPIGENETIQUE DE L'EXPRESSION DES GENES ET CIBLES THERAPEUTIQUES (ADAPTE DE XU ET *AL.*, 2015 (117)) 28

FIGURE 8 ASPECT CYTOLOGIQUE DES LIGNEES JVM-3 ET BONNA-12 32

FIGURE 9 STRUCTURE DU SYSTEME CRISPR-CAS9 D'APRES JINEK ET *AL.*, 2012 (128) 34

FIGURE 10 LE SYSTEME CRISPR-CAS9 ET LA MISE EN JEU DES SYSTEMES DE REPARATION DES CASSURES DOUBLE BRIN DE L'ADN D'APRES GUERNET & GRUMOLATO, 2017 (129) 35

FIGURE 11 PRINCIPE DU SURVEYOR® NUCLEASE ASSAY 38

FIGURE 12 EFFICACITE DE TRANSFECTION DE LA LIGNEE JVM-3 48

FIGURE 13 EFFICACITE DE TRANSFECTION DE LA LIGNEE CM 49

FIGURE 14 RESULTATS DU SURVEYOR® NUCLEASE ASSAY 50

FIGURE 15 RESULTATS DE L'ANALYSE DE FRAGMENTS SUR SEQUENCEUR CAPILLAIRE 51

FIGURE 16 RESULTATS DU SEQUENÇAGE DE KDM6A PAR TECHNIQUE HAUT DEBIT 52

FIGURE 17 ANALYSE PAR WESTERN-BLOT DES EXTRAITS PROTEIQUES DES LIGNEES JVM-3 SAUVAGE (WT) ET EDITEE (CRISPR) INCUBES AVEC LES ANTICORPS INDIQUES. 55

FIGURE 18 ANALYSE PAR WESTERN-BLOT DES EXTRAITS PROTEIQUES DES LIGNEES JVM-3 SAUVAGE (WT) ET EDITEE (CRISPR) INCUBES AVEC DEUX ANTICORPS DIRIGES CONTRE KDM6A (UTX) 55

FIGURE 19 COURBES DE PROLIFERATION DE LA LIGNEE JVM-3 SAUVAGE (WT) ET EDITEE (CRISPR) CULTIVEE DANS DU SVF 10% (GAUCHE) ET 1% (DROITE). 56

FIGURE 20 COMPARAISON DE L'EXPRESSION DE DIFFERENTS MARQUEURS MEMBRANAIRES A LA SURFACE DES CELLULES JVM-3 SAUVAGES (WT) ET EDITEES PAR LE SYSTEME CRISPR-CAS9 (E4) 58

FIGURE 21 CAPACITES D'ADHERENCE DES CELLULES JVM-3 SAUVAGES (WT) ET EDITEES (CRISPR) 59

FIGURE 22 SENSIBILITE DE LA LIGNEE JVM-3 SAUVAGE (WT) ET EDITEE (CRISPR) A DIFFERENTES DROGUES 61

1. Introduction

1.1. La leucémie à tricholeucocytes

1.1.1. Epidémiologie

La leucémie à tricholeucocytes (HCL) a été identifiée pour la première fois en 1958 (1) et constitue une entité à part entière de la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2016 (2). Appartenant aux syndromes lymphoprolifératifs B chroniques matures indolents, la HCL entre dans le cadre plus précis des proliférations à cellules chevelues. C'est une hémopathie maligne rare dont les taux d'incidence standardisés monde sont de 0,5 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et de 0,1 pour 100 000 personnes-années chez la femme, en 2018. Ce taux d'incidence augmente avec l'âge, notamment après 50 ans (données du réseau Francim). La HCL représente environ 2 % des cas de leucémie. Concernant les données épidémiologiques locales en Basse-Normandie, le taux d'incidence y est estimé à 0,71 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et à 0,15 pour 100 000 personnes-années chez la femme. La HCL y représente 3 % des cas de leucémies (données du Registre Régional des Hémopathies Malignes de l'ex-Basse-Normandie). La nette prédominance masculine observée dans les études (sex ratio : 4-5) s'expliquerait par une exposition plus fréquente des hommes à certains facteurs environnementaux (pesticides, dérivés du pétrole ou agents ionisants) (3) et/ou à des modifications génétiques sur le chromosome X susceptibles de favoriser le déséquilibre de sexe (4). L'acquisition d'une mutation sur un gène suppresseur de tumeur porté sur le chromosome X (*ATRX*, *CNKSR2*, *DDX3X*, *KDM5C*, *KDM6A* et *MAGEC3*) serait d'emblée délétère chez l'homme chez lequel le phénomène de lyonisation de l'X n'existe pas. De manière inexpliquée, le tabac constituerait un facteur protecteur chez l'homme (3). La HCL serait associée à un risque accru de cancers secondaires qui sont observés dans 4 à 20 % des cas suivant les études (5). Parmi ces cancers sont retrouvés aussi bien des tumeurs solides que des hémopathies malignes avec une prédominance de lymphomes B non hodgkiniens (5–7) et de tumeurs de la peau (6,8,9). La survenue de ces cancers pourrait être liée soit aux différentes chimiothérapies administrées, soit à la maladie elle-même (5). La HCL induit, en effet,

une altération des défenses immunitaires susceptible d'affaiblir la défense antitumorale (10–12).

Décrite pour la première fois en 1980 (13), la forme variante de la leucémie à tricholeucocytes (HCL-v) est rare et représente environ 10 % des cas de HCL. Son incidence est estimée à 0,03 pour 100 000 personnes-années. Elle constitue une entité provisoire distincte de la forme classique dans la classification OMS 2016. Une prédominance masculine est observée avec un âge médian au diagnostic de 70 ans, plus élevé que dans la HCL (14).

1.1.2. Clinique

La clinique de la HCL et de la HCL-v est dominée par la présence d'une splénomégalie dans deux tiers des cas et l'absence habituelle d'adénopathies. Les patients sont sensibles aux infections bactériennes du fait de l'immunodéficience induite par la maladie (10–12). Ils sont particulièrement susceptibles de contracter des infections à mycobactéries atypiques (15) et la tuberculose est retrouvée jusque dans 8 % des cas (16). La sensibilité à ce type d'infections est liée à l'altération particulière du système monocyte-macrophage (17). Des manifestations hémorragiques liées à la thrombopénie sont plus rarement observées. La clinique est bien souvent fruste et il n'est pas rare que la maladie soit découverte de manière fortuite à l'occasion d'une asthénie ou de la réalisation d'un hémogramme dans une autre indication.

1.1.3. Diagnostic biologique

Dans la HCL, la présence de cytopénies sur l'hémogramme au diagnostic est constante allant souvent jusqu'à la pancytopénie. Il n'existe généralement pas d'hyperlymphocytose. La monocytopénie caractéristique constatée à l'examen morphologique du frottis sanguin contraste avec le compte rendu par les automates d'analyse qui classent les tricholeucocytes en monocytes. L'examen du frottis sanguin identifie des cellules lymphoïdes anormales de taille moyenne à grande, avec un cytoplasme peu basophile, abondant, présentant de fines villosités circonférentielles et un noyau régulier ovale, rond ou réniforme, à la chromatine finement dispersée avec un petit nucléole peu ou pas visible (Figure 1).

Dans la forme variante, l'hémogramme met en évidence une hyperlymphocytose sans monocytopénie. La leucocytose médiane est de 34 G/L (14). Les cellules ont une morphologie à mi-chemin entre la HCL et la leucémie à prolymphocytes B avec la présence quasi-constante d'un nucléole proéminent. Le noyau est parfois bilobé (Figure 1).

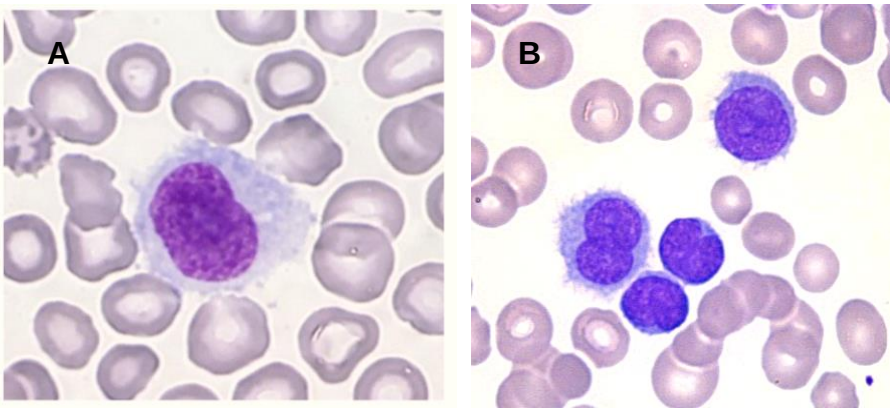


Figure 1 Tricholeucocytes dans le sang périphérique
(A) Tricholeucocyte d'un patient du CHU de Caen atteint de leucémie à tricholeucocytes
(B) Tricholeucocytes d'un patient du CHU de Caen atteint de la forme variante
Frottis sanguins colorés au May-Grünwald Giemsa, x1000

L'examen par cytométrie en flux des cellules sanguines et/ou médullaires est nécessaire au diagnostic. Les tricholeucocytes expriment avec une forte intensité les marqueurs de la lignée B : CD19, CD20, CD22 et présentent une restriction isotypique des chaines légères des immunoglobulines, kappa ou lambda. Les cellules n'expriment généralement pas le CD5 et le CD10 est exprimé dans moins de 10% des cas (18,19). Comme dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), l'expression du CD38 est associée à un mauvais pronostic (20). Un score immunologique a été mis au point afin d'aider au diagnostic et repose sur l'association d'expression des marqueurs CD103, CD123, CD25 et CD11c (Figure 2). Un point est attribué à chaque marqueur positif. Le score est supérieur ou égal à 3 dans la HCL contrairement aux autres proliférations à cellules chevelues (21,22). D'autre part, les tricholeucocytes expriment fortement le CD200 et le CD180. Le ratio de fluorescence CD200/CD180 peut aussi être utilisé pour différencier la HCL de ses diagnostics différentiels (23). Dans la HCL-v, les cellules n'expriment généralement pas le CD123 et le CD25.

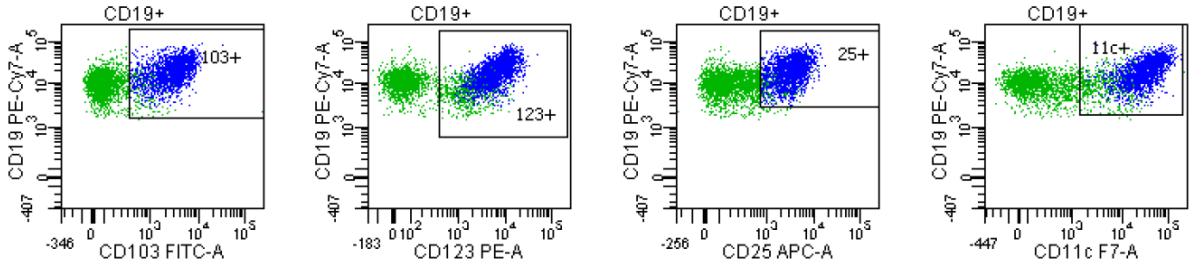


Figure 2 Coexpression des marqueurs CD103, CD123, CD25 et CD11c sur les tricholeucocytes
Tricholeucocytes (population bleue) d'un patient du CHU de Caen. Analyse réalisée sur un cytomètre de flux BD FACS Canto II®, 8 couleurs, au laboratoire d'hématologie du CHU de Caen.

L'examen histologique médullaire est utile pour quantifier la fibrose médullaire. Il montre une infiltration interstitielle caractéristique, avec des cellules en « œuf sur le plat » comportant un noyau rond ou ovale entouré par un cytoplasme abondant. L'examen par immunohistochimie confirme l'infiltration par des cellules lymphoïdes B (CD20+) qui expriment l'annexine A1 et souvent la cycline D1. L'interprétation du marquage à l'annexine A1 peut être complexe en cas d'infiltration tumorale faible puisque c'est aussi un marqueur des cellules myéloïdes (24). La splénectomie n'est pas justifiée pour affirmer le diagnostic. Si elle est réalisée, l'examen histologique montre une infiltration diffuse de la pulpe rouge splénique avec un effacement de la pulpe blanche (24). La HCL-v présente une histologie médullaire et splénique semblable à la forme classique mais il n'est pas retrouvé de positivité du marquage à l'annexine A1 (25).

Dans les cas complexes, il est recommandé de rechercher la mutation *BRAF*^{V600E}, le marqueur moléculaire de la HCL, afin de confirmer le diagnostic (26). La recherche de la mutation conditionne la mise en place d'un traitement par inhibiteur de BRAF ou de MEK. En cas de négativité de la recherche et de forte suspicion de HCL, il faut rechercher une mutation dans l'exon 11 du gène *BRAF*, des mutations alternatives y ayant été identifiées (27).

1.1.4. Physiopathologie

1.1.4.1. Voie des MAP-kinases

La physiopathologie de la HCL et de la HCL-v est caractérisée par une activation constitutive de la voie des *Mitogen Activated protein kinases* (MAPK) induite soit par la mutation *BRAF*^{V600E}, marqueur moléculaire de la HCL mis en évidence en 2011 (26), soit par des mutations de *MAP2K1* dans la HCL-v (28).

La voie des MAPK est une voie de signalisation intracellulaire caractérisée par une cascade de phosphorylation protéique. Elle est activée par des facteurs de croissance, des hormones ou des cytokines qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase. L'autophosphorylation du récepteur suite à la liaison d'un ligand permet l'ancrage au récepteur de protéines adaptatrices telle que GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*). Ces protéines vont ensuite recruter les protéines SOS (*Son Of Sevenless*), qui constituent un facteur d'échange du guanosine diphosphate (GDP) pour les protéines RAS qui sont de petites guanosinetriphosphatases. La protéine RAS activée par sa liaison au guanosine triphosphate (GTP) va se lier à différents effecteurs dont la kinase BRAF qui va phosphoryler et activer les kinases MEK1 et MEK2 (*Mitogen activated protein/Extracellular signal-regulated Kinase*) qui vont-elles-mêmes phosphoryler et activer les kinases ERK1 et ERK2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). La protéine ERK migre dans le noyau et active des facteurs de transcription provoquant des signaux de prolifération, de survie et d'invasion (29)(Figure 4).

La mutation *BRAF*^{V600E}, localisée dans le domaine kinase, entraine une activation constitutive de BRAF (26). Lors de sa description initiale, la détection de la mutation *BRAF*^{V600E} a été constante dans la HCL et absente dans les autres syndromes lymphoprolifératifs B chroniques. En réalité, cette mutation n'est pas spécifique de la HCL et elle est retrouvée dans plus de 50 % des cas de mélanomes et, avec une moindre fréquence, dans d'autres hémopathies malignes, comme la LLC ou le myélome multiple (MM), et tumeurs solides (cancer bronchique non à petites cellules, etc.). La mutation *BRAF*^{V600E} n'est pas identifiée dans un sous-groupe de patients HCL

de mauvais pronostic correspondant aux patients dont les cellules tumorales possèdent un réarrangement du locus des chaines lourdes des immunoglobulines de type *IGHV4-34* (30,31).

La présence de mutations de *MAP2K1,* qui code pour la protéine MEK, est identifiée dans plus d'un tiers des cas de HCL-v (28). Ces mutations, localisées principalement au niveau du domaine d'auto-régulation négative du gène, entrainent une activation constitutive de MEK1. Selon leur localisation, elles peuvent augmenter la sensibilité aux inhibiteurs de MEK ou, au contraire, induire une résistance (28).

Les mutations de *BRAF* et de *MAP2K1* sont mutuellement exclusives.

En dehors de son rôle dans la survie et la prolifération des cellules tumorales, la voie des MAPK intervient dans la morphologie chevelue des tricholeucocytes. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de BRAF permet la réversion du phénotype villeux et une diminution d'expression d'*ACTB* (ß-actine) et de *LST1*, qui codent pour des protéines impliquées dans la formation du cytosquelette (32).

La mutation $BRAF^{V600E}$ est retrouvée dans les cellules souches hématopoïétiques des patients atteints de HCL. Dans les tricholeucocytes circulants de ces patients, des mutations dans des gènes autres que *BRAF* ont été décrits et n'ont pas été retrouvées dans les cellules souches $BRAF^{V600E}$ (33). Ces données suggèrent que la mutation $BRAF^{V600E}$ serait un événement génétique précoce et que l'apparition d'anomalies génétiques additionnelles serait nécessaire au développement de la maladie.

Le développement des techniques de séquençage à haut débit a permis d'étoffer nos connaissances concernant le profil mutationnel de la HCL et de la HCL-v et d'identifier des mutations additionnelles récurrentes associées à $BRAF^{V600E}$ (26,28,34–37). L'ensemble des variants génétiques d'intérêt avec leur fréquence dans les différentes études de séquençage à haut débit sont regroupés dans l'annexe 1 (38). Les mutations impliquant des régulateurs épigénétiques seront abordées dans le chapitre 1.2 dédié à la protéine KDM6A. Ces mutations pourraient jouer un rôle dans l'initiation et/ou la progression de la maladie et apportent un éclairage sur la physiopathologie de la HCL.

1.1.4.2. Voie du BCR

Les données moléculaires, de méthylome et de transcriptomique suggèrent un rôle prépondérant de la voie du récepteur des cellules B (BCR) et des voies sous-jacentes dans la physiopathologie de la HCL.

Si il fut un temps supposer que le tricholeucocyte pouvait avoir une origine monocytaire, il est plus communément admis aujourd'hui qu'il dériverait d'une cellule B-mémoire post-centre germinatif activée. En effet, le profil transcriptomique des tricholeucocytes est proche de celui des lymphocytes B post-centre germinatif (39). De plus, la présence d'un profil muté du gène codant pour la partie variable des chaines lourdes des immunoglobulines chez plus de 90 % des patients HCL suggère un passage de la cellule tumorale par le centre germinatif où a lieu le phénomène d'hypermutation somatique (30,40). L'activation du BCR suite à une stimulation antigénique semble ainsi importante dans le processus oncogénique conduisant à la HCL. De manière générale, la voie du BCR joue un rôle central dans l'homéostasie du lymphocyte B. Le BCR peut être activé soit par la fixation d'un antigène provenant du microenvironnement, soit de manière indépendante de l'antigène, par un signal dit « tonique ». Ce dernier induit une activation basale permanente du BCR permettant à la cellule B de survivre sans signal antigénique. L'activation du BCR entraine le recrutement de kinases telles que Lyn et SYK (tyrosine kinase de la rate) qui phosphorylent les motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITAMs) des protéines du complexe BCR, CD79a et CD79b. Cette phosphorylation permet le recrutement de protéines adaptatrices et d'autres kinases telles que la tyrosine kinase de Bruton (BTK) ou la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). L'activation de ces molécules conduit à l'induction en aval des voies AKT/mTOR (*mammalian target of rapamycin*), NF-κB (*Nuclear Factor-κB*) et/ou MAPK. Ces voies contrôlent de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la survie et la migration et sont essentiels à la survie du lymphocyte B normal mais aussi du clone pathologique dans certaines hémopathies lymphoïdes B comme la LLC ou le lymphome du manteau.

Dans la HCL, il a été démontré *in vitro* que le BCR pouvait être activé dans les tricholeucocytes et entrainait la mobilisation du calcium intracellulaire, l'activation de

la voie PI3K/AKT/mTOR et de la voie des MAPK (41). De plus, la voie du NF-κB située en aval du BCR est dérégulée dans la HCL. L'étude *in silico* de l'expression génique dans la HCL montre une surexpression des gènes régulés par cette voie (42). D'autre part, des mutations de *KLF2* sont rapportées dans 10 à 16 % des cas de HCL, en association avec la mutation $BRAF^{V600E}$ (Annexe 1). KLF2 est un facteur de transcription agissant comme régulateur négatif de la voie NF-κB (Figure 4) (43). Il intervient également dans les phénomènes de domiciliation cellulaire en induisant l'expression du CD62L, une sélectine impliquée dans la localisation des lymphocytes au niveau du ganglion (44). Les mutations décrites dans la HCL sont localisées près du domaine en doigt de zinc ou du signal d'export nucléaire. Ces mutations ont déjà été décrites dans le lymphome de la zone marginale splénique (SMZL): elles pourraient affecter l'activité facteur de transcription de KLF2 *via* une relocalisation cytoplasmique de la protéine (45). L'ensemble de ces données suggère que les mutations de *KLF2* dans la HCL pourraient expliquer la localisation extra-ganglionnaire de la maladie et la dérégulation de la voie NF-κB.

L'étude du méthylome de la HCL (46) concorde avec les données mutationnelles et montre une hypométhylation des acteurs de la voie du BCR.

1.1.4.3. Autres processus cellulaires d'intérêt

Cycle cellulaire

Des mutations inactivatrices de *CDKN1B* sont observées dans 10 à 16 % des cas de HCL, toujours associées à $BRAF^{V600E}$ (Annexe 1). *CDKN1B* code pour la protéine p27 qui contrôle la progression des cellules dans le cycle cellulaire en se liant et en inactivant les complexes cycline-CDK (*Cyclin Dependent Kinase*). La protéine p27 a ainsi une activité antagoniste vis-à-vis de la cycline D1 (47) qui est surexprimée dans la HCL (39,48). La cycline D1 est responsable de la phosphorylation des protéines du rétinoblastome permettant la progression des cellules en phase G1 du cycle. Dans la HCL-v, une mutation activatrice de *CCND3* qui code pour la cycline D3 a été observée (36). Elle entrainerait une perte du domaine PEST, contrôlant la dégradation protéique,

et augmenterait ainsi l'expression de la cycline D3 qui intervient comme la cycline D1 au niveau de la phase G1 du cycle cellulaire (49).

Concernant le gène suppresseur de tumeur *TP53,* son inactivation par mutation ou par délétion du bras court du chromosome 17 est rare dans la HCL et un peu plus fréquente dans la HCL-v (Annexe 1). La protéine p53 est activée en réponse à divers stress comme les dommages à l'ADN, le stress oxydatif ou des signaux oncogéniques. Elle induit l'expression de gènes impliqués dans de nombreuses voies cellulaires incluant l'arrêt du cycle, la sénescence, certaines voies du métabolisme et l'apoptose. L'inactivation de p53 crée un contexte favorable à l'accumulation d'événements oncogéniques additionnels. La recherche de délétions/mutations de *TP53* garde tout son intérêt en cas de maladie réfractaire aux premières lignes de traitement, l'altération de la fonction de p53 étant connue pour conférer une résistance aux chimiothérapies (50).

Spliceosome

Le spliceosome est un complexe constitué d'ARN et de protéines qui a pour rôle d'exciser les introns des ARN pré-messagers ce qui constitue l'épissage. Des mutations du gène *U2AF1* ont été identifiées dans la HCL-v (Annexe 1). Les mutations d'*U2AF1* sont fréquentes dans les syndromes myélodysplasiques (SMD) et les leucémies aigues myéloïdes (LAM) mais n'ont pas été décrites dans les hémopathies lymphoïdes (51). U2AF1 est un des composants du spliceosome qui reconnait et se lie au site d'épissage en 3'. L'identification de ces mutations dans la HCL-v pourrait avoir un intérêt théranostique en sensibilisant les tricholeucocytes aux drogues modulant l'épissage (52).

1.1.4.4. Interactions du tricholeucocyte avec son microenvironnement

Les tricholeucocytes infiltrent préférentiellement le sang, la moelle osseuse et les sinusoïdes de la rate et du foie et peu les ganglions.

Les tricholeucocytes expriment à leur surface le récepteur CXCR4 sur lequel va venir se fixer la chimiokine médullaire, CXCL12 (SDF-1) permettant leur adressage au compartiment médullaire. Les intégrines VLA-4 (CD49d) et VLA-5A (CD49e) leur permettent de se lier au VCAM-1 (CD106) et à la fibronectine des cellules stromales et endothéliales de la niche hématopoïétique. L'implantation des tricholeucocytes dans cette niche va favoriser leur survie et leur pharmacorésistance. Dans la moelle osseuse, les tricholeucocytes induisent une fibrose spécifique par interaction, *via* le CD44, avec l'acide hyaluronique entrainant la production autocrine du facteur de croissance des fibroblastes FGF-2 et de fibronectine (53) (Figure 3). Ils sécrètent également du facteur de croissance transformant TGF-β1 induisant une synthèse accrue de collagène et de réticuline par les fibroblastes (54).

La localisation des tricholeucocytes dans la pulpe rouge splénique est due à l'expression forte à leur surface de l'intégrine αVβ3 (CD51) qui va se lier à la vitronectine (55).

L'absence d'expression à la surface des tricholeucocytes du CXCR5, du CCR7 et de la L-sélectine peut expliquer l'absence de localisation ganglionnaire et ainsi l'absence d'adénopathies généralement observée chez les patients (55).

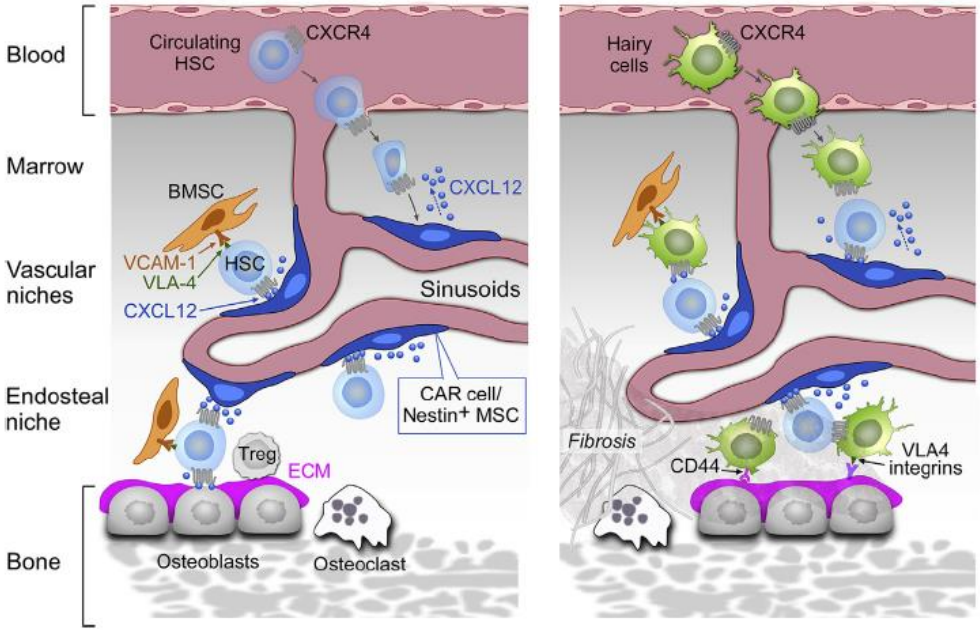


Figure 3 Interactions des tricholeucocytes avec le microenvironnement médullaire (55)

1.1.1. Prise en charge thérapeutique

Le traitement de la HCL doit être initié en cas de maladie symptomatique ou si l'hémogramme montre une hémoglobine < 11 g/dL, une thrombopénie < 100 G/L ou une neutropénie < 1 G/L (50).

Le traitement de référence de première ligne fait appel aux analogues de purines (PNA) : la pentostatine et la cladribine. Le taux de réponse global est supérieur à 95 % et le taux de réponse complète (RC) supérieur à 75 % avec une médiane de survie sans rechute de 15 ans. Il n'a pas été observé de différence d'efficacité entre la pentostatine et la cladribine (56).

Des rechutes après obtention d'une RC sont observées dans 14 à 46% des cas après pentostatine dans des études avec des médianes de suivi de 5 à 11 ans et dans 27 à 37 % des cas après cladribine pour des médianes de suivi de 7 à 10 ans (57). Les taux de rechute sont plus importants, supérieurs à 50 %, pour les patients ayant seulement obtenu une réponse partielle après la première ligne. Globalement, un quart des patients vont rechuter avant 5 ans et, à long terme, la moitié d'entre eux (56).

Le choix thérapeutique en cas de rechute ou de maladie réfractaire doit prendre en compte le temps écoulé avant la rechute, la présence ou non d'une mutation de *BRAF*, le statut mutationnel de *TP53* et le profil de la partie variable des chaines lourdes des immunoglobulines (profil VH4-34 de mauvais pronostic) (58).

En cas de rechute tardive (> 2 ans), il est possible de réadministrer un analogue de purine en l'associant si besoin à un anticorps anti-CD20, le rituximab. Les taux de RC obtenus après l'utilisation de PNA en seconde ligne sont plus faibles qu'en première ligne, autour de 60%. Il n'a pas été montré d'effet bénéfique à substituer un analogue de purine par un autre en seconde ligne (5,56).

En cas de rechute précoce (< 2 ans) et d'identification de la mutation $BRAF^{V600E}$, un traitement par le vémurafénib, un inhibiteur de BRAF peut être envisagé. Le vémurafénib permet l'obtention d'une réponse globale dans 96 à 100 % des cas, avec une réponse complète dans 35 à 40 % des cas (59). Certains patients avec une HCL développent une résistance aux inhibiteurs de *BRAF* mais les mécanismes restent à ce jour peu connus. Dans le mélanome, la plupart des mécanismes de résistance aboutissent soit à une réactivation de la voie des MAPK, soit à une activation anormale de la voie PI3K/AKT. Concernant la voie des MAPK, l'action des inhibiteurs de BRAF peut être contournée par l'émergence d'une mutation activatrice d'un autre effecteur de la voie, *NRAS, KRAS* (36) ou *MAP2K1*, par amplification du nombre de copies du gène *BRAF* muté ou par épissage alternatif de *BRAF,* générant une protéine insensible aux inhibiteurs spécifiques (60). Il a déjà été identifié des mutations de *KRAS* chez des patients HCL devenus résistants au vémurafénib. Afin d'améliorer la réponse aux inhibiteurs de BRAF et de contourner les mécanismes de résistance, des stratégies basées sur l'utilisation simultanée d'inhibiteurs de BRAF et de MEK1 (NCT02034110) ou sur l'association du vémurafénib à un anticorps monoclonal recombinant humain anti-CD20 de type II, l'obinutuzumab (NCT03410875) sont actuellement en cours d'étude. L'association inhibiteurs de BRAF (dabrafénib) et inhibiteurs de MEK (trametinib) peut également permettre de réduire la toxicité essentiellement cutanée des inhibiteurs de BRAF (61).

Le moxetumomab pasudotox peut être administré en cas d'absence de la mutation *BRAF*^{V600E} ou de résistance aux inhibiteurs de BRAF. C'est un anticorps monoclonal anti-CD22 couplé à une toxine de *Pseudomonas*. Son utilisation dans le cadre d'un essai clinique a montré des résultats encourageants avec l'obtention de 75 % de réponse globale (réponses partielles et complètes) chez 80 patients ayant reçu préalablement au moins deux lignes de traitement. Le traitement est plutôt bien toléré et les effets indésirables potentiellement graves à retenir sont les risques de syndrome de fuite capillaire (8,8 %) et le syndrome hémolytique et urémique (7,5 %) (62).

La signalisation du BCR peut être ciblée par des inhibiteurs de BTK tel que l'ibrutinib. L'ibrutinib a montré *in vitro* sa capacité à inhiber la prolifération et la survie des tricholeucocytes (41). Les résultats intérimaires d'un essai clinique de phase II sur 13 patients en rechute ou réfractaires mettent en évidence un taux de réponse globale de 46 % avec une seule réponse complète (63).

Une splénectomie peut être envisagée en cas de splénomégalie symptomatique importante avec une faible infiltration tumorale de la moelle osseuse.

La survie globale des patients ayant reçu une première ligne de traitement est de plus de 90 % à 5 ans et autour de 80 % à 15 ans (5,56).

La HCL-v est une maladie plus agressive que la HCL et est résistante aux PNA utilisés en monothérapie. En première ligne, ces derniers devront être associés au rituximab. En seconde ligne, le moxetumomab pasudotox peut être utilisé. Aucune réponse complète n'a été obtenue chez les 3 patients atteints de HCL-v dans l'étude de phase 3 (62). L'utilisation de l'ibrutinib est également envisageable avec plusieurs cas publiés montrant des résultats encourageants (64,65). Le taux de survie globale de la HCL-v à 5 ans est de 57 % dans une série de patients publiée en 2012 (66). Une étude parue plus récemment rapporte, elle, un taux de survie globale de 84 % à 5 ans (67).

Les différentes voies de signalisation impliquées dans la physiopathologie de la HCL et les différents traitements envisageables sont représentés sur la Figure 4.

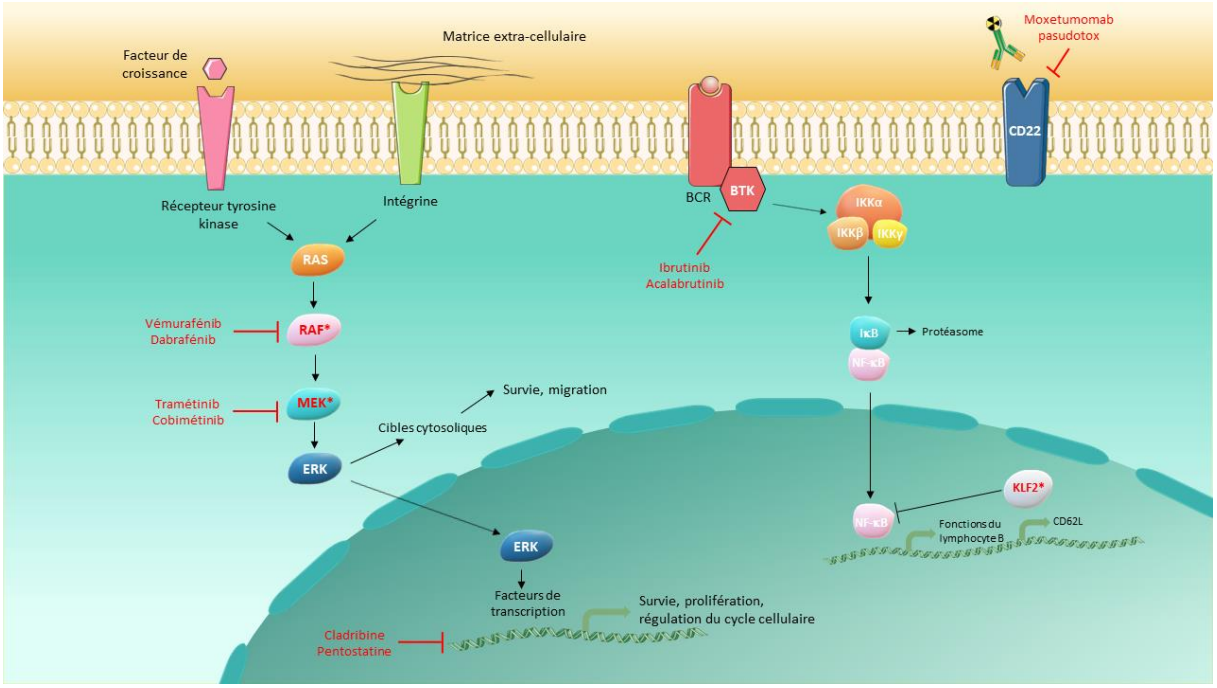


Figure 4 Cibles thérapeutiques au sein des différentes voies de signalisation cellulaire impliquées dans la physiopathologie de la leucémie à tricholeucocytes et/ou sa forme variante
Les protéines en rouge avec un astérisque sont fréquemment dérégulées dans la HCL et/ou la HCL-v.

1.1.2. Autres proliférations à cellules chevelues

En dehors de la leucémie à tricholeucocytes et de sa forme variante, la catégorie des proliférations lymphocytaires B à cellules chevelues comprend deux autres entités qui sont le lymphome de la zone marginale splénique (SMZL) et le lymphome diffus de la pulpe rouge splénique (SDRPL) (25). En l'absence de mise en évidence de la mutation *BRAF*^{V600E}, réaliser la distinction entre ces diagnostics différentiels peut être difficile. L'histologie splénique mettant en évidence un aspect nodulaire particulier peut permettre de différencier aisément le SMZL des autres proliférations. L'aspect cytologique est également un élément d'orientation. Dans le SMZL, la population lymphocytaire est hétérogène. Les villosités sont, de plus, préférentiellement polaires alors qu'elles sont circonférentielles dans les autres cas. Au niveau moléculaire, des mutations sont fréquemment retrouvées dans les gènes *NOTCH2*, *KLF2* et les régulateurs de l'épigénétique dans le SMZL (68). Les zones de chevauchement sont plus importantes entre la HCL-v et le SDRPL et le diagnostic repose alors sur un faisceau d'arguments. Certains auteurs suggèrent que la HCL-v pourrait être la forme transformée du SDRPL (69). Le profil génétique peut être une aide pour les différencier. Dans le SDRPL, il a été retrouvé une expression anormale de la cycline D3 et des mutations de *BCOR* (49,70) alors que dans la HCL-v, il est retrouvé des mutations de *MAP2K1* (28)(Tableau 1).

La distinction de ces entités est importante d'un point de vue thérapeutique. Dans le SMZL sera privilégiée l'association du rituximab avec une chimiothérapie de type bendamustine ou CHOP (cyclophosphamide, hydroxyadriamycine, vincristine et prednisone) (71). En ce qui concerne le SDRPL, maladie indolente, l'abstention thérapeutique est de mise en cas d'absence de symptômes. La splénectomie est privilégiée en cas de gêne exprimée par le patient (69).

Tableau 1 Diagnostics différentiels de la leucémie à tricholeucocytes

	HCL	HCL-v	SDRPL	SMZL
Age moyen (années)	55	70	70	70
Splénomégalie	Oui	Oui	Oui	Oui
Lymphocytose	Faible	Elevée	Modérée	Modérée
Monocytopénie	Présente	Absente	Absente	Absente
Aspect cytologique				
Villosités	Circonférentielles	Circonférentielles	Circonférentielles à base large	Polaires
Noyau	Rond, ovale ou réniforme	Rond ou ovale, parfois bilobé	Rond, parfois excentré	Rond
Nucléole	Absent ou peu visible	Proéminent	Absent ou peu visible	Absent ou peu visible
Histologie de la rate	Diffuse	Diffuse	Diffuse	Nodulaire
Immunophénotype				
CD11c	+++	+	+ (50%)	+f (39%)
CD103	+++	+	+ (10%)	+ (40%)
CD123	+++	-	-	-
CD25	+++	-	+ (25%)	+ (44%)
CD200	+++	Non déterminé	+++	+
CD180	+++	-	-	-
Annexine A1	+	-	-	-
IGHV	IGHV3-23 21% IGHV4-34 10% IGHV3-30 8%	IGHV4-34 36%	IGHV3-23 IGHV4-34	IGHV1-2 25% IGHV4-34 13% IGHV3-23 8%
Profil génétique	*BRAF*^{V600E} (>90%)	*MAP2K1* (30-40%)	*CCND3* (21-24%) *BCOR* (24%)	*NOTCH2* (10-25%) *KLF2* (20-40%) Régulateurs épigénétiques (40%)

1.2. KDM6A, une protéine de l'épigénétique

1.2.1. Epigénétique et leucémie à tricholeucocytes

Le terme épigénétique englobe les processus cellulaires qui modifient l'expression des gènes sans altérer la séquence de l'ADN. Les modifications induites sont réversibles et transmissibles lors des divisions cellulaires. On distingue la méthylation des ilots CpG (cytosine-phosphate-guanine) de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones.

La méthylation des cytosines au sein des dinucléotides CpG de l'ADN est catalysée par les enzymes méthyltransférases de l'ADN (DNMT) (72). Les ilots CpG ne sont pas répartis de manière égale dans le génome mais sont retrouvés principalement au niveau des promoteurs. L'hyperméthylation de ces ilots entraine une extinction transcriptionnelle soit par encombrement, soit par modification conformationnelle de l'ADN. Dans le cancer, il est communément admis qu'il existe une hypométhylation globale du génome contrastant avec une hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs.

Les modifications post-traductionnelles des histones régulent le niveau de compaction de la chromatine et l'accessibilité des gènes à la machinerie transcriptionnelle. Quatre principaux types sont décrits : la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation (Figure 5) (72). Si l'acétylation est clairement associée à l'activation transcriptionnelle et la désacétylation à la répression, le rôle de la méthylation est en revanche plus complexe. Ainsi, la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27) est corrélée à une répression transcriptionnelle alors que la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) est associée à une activation (73).

Des coopérations existent entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. Ainsi, la protéine MeCP2 (*Methyl CpG binding Protein 2*) se fixe au niveau des cytosines méthylées de l'ADN et va permettre le recrutement d'histones désacétylases créant un environnement épigénétique répresseur de la transcription (74).

Ces dernières années, les études de séquençage à haut débit ont permis la mise en évidence de la récurrence de variants délétères au sein des gènes codant pour des régulateurs épigénétiques dans de nombreux types de cancer (72). L'amélioration de la compréhension de la physiopathologie de ces processus oncogéniques nous permet d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi les thérapies ciblées qui sont les plus avancées dans le développement clinique, nous pouvons citer la 5-azacytidine, un agent déméthylant de l'ADN, ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans les syndromes myélodysplasiques ; le vorinostat, un inhibiteur d'histone désacétylase (HDACi) ayant une AMM dans les lymphomes T cutanés ; ou encore le tazemetostat (EPZ-6438), un inhibiteur d'EZH2 (*Enhancer of Zest Homolog 2)*, actuellement en cours d'évaluation dans des études de phases I et II dans différents types de cancer (75,76). Les principaux processus de régulation de la chromatine et les acteurs protéiques impliqués sont représentés dans la Figure 5.

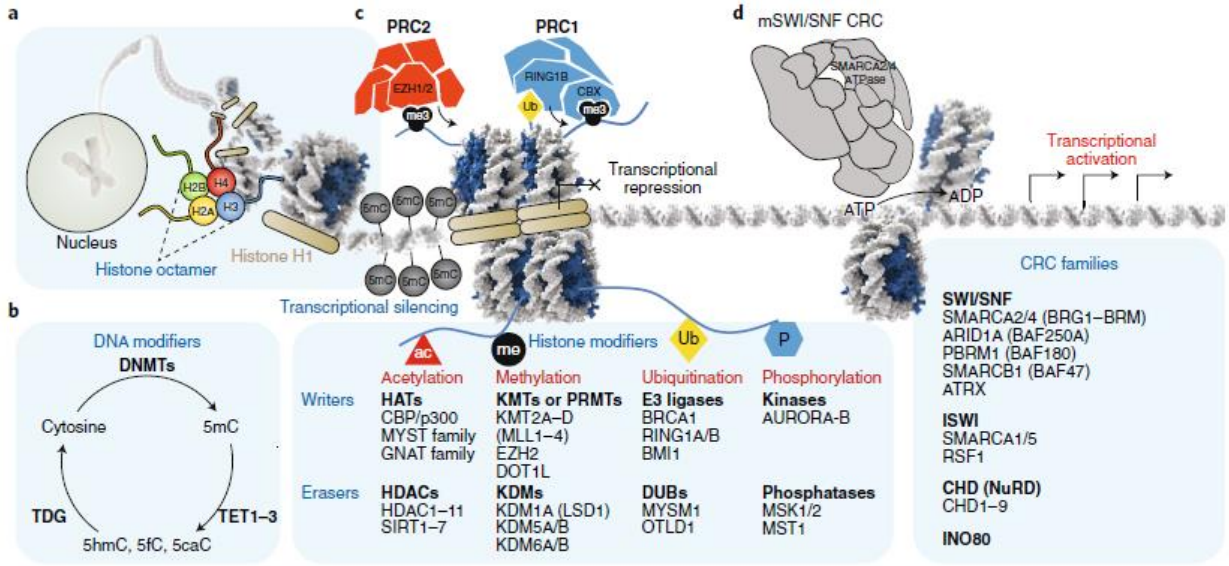


Figure 5 Processus de régulation de la chromatine (72)

Dans la HCL et la HCL-v sont retrouvées principalement des variants au sein des gènes codant pour des protéines responsables des modifications post-traductionnelles des histones : *KMT2C* (*MLL3*), *ARID1A*, *ARID1B*, *CREBBP*, *KDM6A* (*UTX*) et *EZH2* (Annexe 1) (26,28,34–37). Nous nous attarderons davantage sur les variants de *KDM6A* qui nous intéressent dans ce projet dans le paragraphe 1.2.2.

La lysine N-méthyltransférase 2C (KMT2C) intervient au sein d'un complexe de protéines associées à SET1 (COMPASS) et est responsable de la monométhylation de H3K4. La méthylation de H3K4 colocalise avec l'acétylation de H3K27 créant un environnement épigénétique favorable à la transcription. KMT2C aurait également un rôle coactivateur vis-à-vis de p53 (77).

Le gène *CREBBP* code pour la nucléo phosphoprotéine CBP (*CREB binding protein*), exprimée de manière ubiquitaire et appartenant à la famille des histone/protéine lysine acétyltransférases KAT3. CBP, associée à p300, intervient dans la régulation de nombreuses voies cellulaires. Elle module la transcription des gènes par acétylation des lysines 18 et 27 de l'histone H3 (Figure 7) et par stabilisation des interactions entre les complexes de transcription et des protéines additionnelles. *CREBBP* est classiquement considéré comme un gène suppresseur de tumeur, notamment parce qu'il favorise l'activation d'autres gènes suppresseurs de tumeur dont *TP53* (78). Dans les leucémies aigues lymphoblastiques B présentant des mutations activatrices du gène *KRAS*, la perte d'expression de *CREBBP* favoriserait l'activation de la voie des MAPK (79).

ARID1A et ARID1B (*AT-rich interactive domain 1A/1B*) sont des protéines faisant partie du complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*). Les enzymes de remodelage de la chromatine catalysent un large éventail de transformations de la chromatine incluant le glissement des octamères d'histone le long de l'ADN et la modification de la composition de ces octamères et de la conformation de l'ADN nucléosomal (80). Des mutations affectant des sous-unités du complexe SWI/SNF sont fréquemment retrouvées en cancérologie. Les dysfonctions engendrées toucheraient à la fois les fonctions transcriptionnelles de SWI/SNF comme la modification de sites de fixation de facteurs de transcription et non

transcriptionnelles comme la dérégulation des systèmes de réparation de l'ADN et de remodelage de la chromatine (81). Les mutations d'*ARID1B* sont moins fréquentes que celles d'*ARID1A*. Ce sont majoritairement des mutations inactivatrices. Leurs conséquences fonctionnelles sont encore peu étudiées. Les mutations d'*ARID1B* sont plus connues pour leur rôle dans les anomalies du développement neurologique comme le syndrome Coffin-Siris (hypoplasie de la phalange distale du cinquième doigt, troubles du développement, déficit intellectuel, etc.).

Enfin, il a été retrouvé de rares mutations inactivatrices d'*EZH2* dans la HCL. Dans les hémopathies lymphoïdes comme le lymphome B diffus à grandes cellules et le lymphome folliculaire, il est plus fréquemment décrit des mutations activatrices d'*EZH2* favorisant la prolifération et l'auto-renouvellement des lymphocytes B tumoraux (82,83). La protéine EZH2 est une des deux enzymes du complexe PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) qui est capable de di- et tri-méthyler H3K27. Cette marque épigénétique permet ensuite le recrutement du complexe PRC1 qui maintient la répression des gènes cibles soit par compaction de la chromatine, soit par interaction directe avec la machinerie transcriptionnelle (84).

1.2.2. KDM6A et leucémie à tricholeucocytes

Nous nous sommes particulièrement intéressés à *KDM6A* car nous avons retrouvé des mutations clonales de ce gène chez la moitié des patients atteints de HCL-v de notre cohorte (2/4) (37,64). De plus, les données de la littérature mettent en avant le rôle suppresseur de tumeur de KDM6A et de nouvelles stratégies de thérapie ciblée.

Le gène *KDM6A*, aussi appelé *UTX* (*Ubiquitously Tetratricopeptide Repeat on chromosome X*), est localisé sur le chromosome X, possède 29 exons et code pour la protéine du même nom, la lysine déméthylase 6A. *KDM6A* fait partie des gènes échappant à l'inactivation de l'X, ou lyonisation, chez les femmes et possède un paralogue sur le chromosome Y, le gène *UTY*.

Un variant situé sur un site accepteur d'épissage entrainant un saut complet de l'exon 24 du gène a été identifié chez le patient UPN-v1 dans un échantillon sanguin du diagnostic (Figure 6). L'exon 24 est situé dans la partie codant pour le domaine

catalytique de la protéine. Le ratio de fréquence allélique en fonction de l'infiltration tumorale (rVAF) était de 0,99. Une mutation sous-clonale du gène *MAP2K1* a également été retrouvée chez ce patient avec une rVAF de 0,07. Le patient UPN-v1 a été diagnostiqué à l'âge de 64 ans et présente une maladie multiréfractaire ayant nécessité l'utilisation de plusieurs lignes thérapeutiques successives : rituximab-cladribine, moxetumomab pasudotox, splénectomie et ibrutinib (37,64). Une analyse génétique a pu être réalisée sur un échantillon sanguin à la rechute post traitement par moxetumomab pasudotox et a montré une augmentation nette de la fréquence allélique du variant de *MAP2K1* (rVAF=0,41) et une stabilité de la fréquence allélique du variant de *KDM6A*.

Un variant de type délétion avec décalage du cadre de lecture dans l'exon 12 du gène, en amont de la partie codant pour le domaine catalytique de la protéine, a été identifié dans un échantillon de rate en suivi du patient UPN-v2 (Figure 6). La rVAF était de 1,01. Le patient UPN-v2 a été diagnostiqué à l'âge de 72 ans, n'a pas répondu à une première ligne thérapeutique et a été splénectomisé.

Le locus *KDM6A* étant sur le chromosome X, ceci explique la VAF proche de l'infiltration tumorale liée à la perte d'hétérozygotie chez les sujets masculins.

Les mutations de *KDM6A* ne sont pas restreintes à la forme variante puisqu'elles ont été retrouvées à deux reprises chez des patients atteints de la forme classique dans des études de séquençage complet d'exome. Une mutation non-sens est apparue chez un patient atteint de HCL mutée $BRAF^{V600E}$ lors d'une rechute après un traitement de première ligne par inhibiteur de BRAF (34). L'autre mutation a été retrouvée chez un homme de 80 ans atteint d'une HCL sans mutation du gène *BRAF* et avec un profil des gènes codant pour la partie variable des chaines lourdes des immunoglobulines de type V_H4-34. Ce sous-type est décrit comme de plus mauvais pronostic (28).

KDM6A est une histone déméthylase qui cible les marques di- et tri-méthyl de H3K27 favorisant la transcription des gènes (85,86). Son activité déméthylase est dépendante de son domaine catalytique Jumonji C qui contient des résidus acides aminés conservés permettant la liaison avec ses cofacteurs, le fer et l'α-cétoglutarate. La

protéine possède également un domaine de liaison au zinc responsable de la spécificité de l'activité déméthylase envers H3K27 en prévenant la fixation de KDM6A sur la lysine 9 de l'histone H3. Les domaines tétratricopeptides, quant à eux, permettent les interactions protéine-protéine (Figure 6) (85). Au contraire de KDM6A, l'activité déméthylase de son paralogue UTY semble très faible (environ 2,6 % de l'activité de KDM6A) ce qui est dû à la substitution d'un acide aminé critique dans le domaine Jumonji C (87). L'activité de KDM6A s'oppose à celle de l'enzyme EZH2 du complexe PRC2.

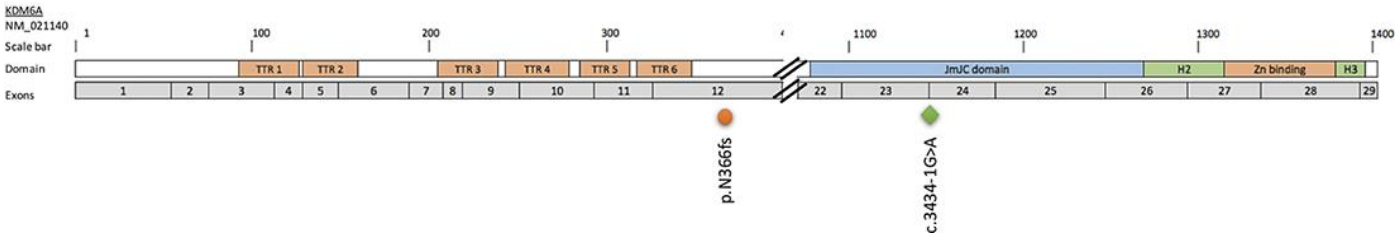


Figure 6 Représentation des variants retrouvés dans *KDM6A*
Le cercle orange correspond à une délétion et le losange vert à un variant d'épissage. Ils représentent les variants retrouvés chez les patients UPN-v1 et UPN-v2 respectivement (d'après Maitre et *al.*, 2018 (37)). Abréviations : TPRs : répétitions tétratricopeptides ; JmJC : domaine Jumonji C ; H2-H3 : domaines hélicoïdaux 2 et 3 ; Zn binding : domaine de liaison au zinc.

L'activité déméthylase de KDM6A est impliquée dans l'embryogenèse et la différenciation cellulaire.

La suppression de KDM6A dans des cellules humaines augmente la di- et triméthylation de H3K27 au niveau des promoteurs des gènes Hox (Homeobox), conduisant à leur non-transcription (88). Les gènes Hox sont des régulateurs transcriptionnels hautement conservés qui sont essentiels au bon développement de l'axe antéropostérieur de l'embryon (89). En lien avec cette activité de régulateur des gènes Hox durant l'embryogenèse, la présence de variants délétères constitutionnels de *KDM6A* entraine un syndrome de Kabuki décrit pour la première fois en 1981 (90). Ce syndrome est caractérisé par un retard mental, des anomalies d'organes et de squelette et une dysmorphie faciale.

D'autre part, l'expression de KDM6A semble être associée à une répression de la différenciation cellulaire. Son expression facilite, par son activité déméthylase,

l'induction de la pluripotence au cours du processus de synthèse des cellules souches pluripotentes induites. KDM6A semble également être un partenaire direct des facteurs de reprogrammation OCT4, KLF4 et SOX2 (91). Durant l'hématopoïèse, il a été observé une diminution de l'expression de KDM6A au cours de la différenciation cellulaire (92). La suppression de l'expression de KDM6A chez des souris âgées de 11 à 14 semaines entraine un élargissement de la rate, une anémie, une thrombopénie et des signes de dysplasie. Il est également observé une diminution d'expression de divers facteurs de transcription hématopoïétiques (93). KDM6A est ainsi essentielle au développement d'une hématopoïèse normale.

En dehors de son activité catalytique propre de déméthylase, KDM6A participe à l'activité d'autres complexes protéiques.

KDM6A interagit physiquement avec des protéines des complexes COMPASS qui sont responsables de la méthylation de H3K4. Ces complexes sont constitués de lysine méthyltransférases (KMT2D, KMT2C, etc.) possédant un domaine SET qui porte l'activité catalytique, et de protéines structurelles comme PTIP (*Pax transactivation domain-interacting protein*) (94). Des liens physiques ont été démontrés entre KDM6A et PTIP (95) et entre KDM6A et KMT2C/KMT2D (96). De plus, KDM6A agit comme intermédiaire protéique entre les complexes COMPASS et l'histone acétyltransférase p300 qui acétyle H3K27 (97). Ces interactions physiques s'accompagnent d'effets fonctionnels, indépendants de l'activité déméthylase de KDM6A. Ainsi, chez la drosophile et dans des cellules de mammifères, la perte d'expression de KDM6A engendre une diminution des taux de monométhylation de H3K4 et d'acétylation de H3K27 (97,98). De même, dans le myélome multiple et le cancer du pancréas, une modulation importante de ces deux marques épigénétiques a été observée dans les cellules tumorales ayant perdu l'expression de KDM6A (99,100). L'association de KDM6A et de KMT2D/KMT2C concoure au maintien de la transcription des gènes Hox durant le développement embryonnaire (88).

KDM6A promeut également l'activité du complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant SWI/SNF par des interactions démontrées avec les protéines BRG1 et BRM (101,102).

Enfin, KDM6A interagit physiquement avec la protéine SPT6 qui est impliquée dans la maintenance de la structure de la chromatine au cours de l'élongation transcriptionnelle (103). SPT6 promeut et stabilise la fixation de KDM6A à la chromatine. SPT6, KDM6A et l'ARN polymérase II colocalisent au niveau de zones où H3K27 est déméthylée (104). Ces protéines coopèrent pour maintenir la transcription active.

KDM6A exerce ainsi de multiples fonctions permettant de moduler le paysage épigénétique à la fois par son activité propre de déméthylase mais également par sa capacité à recruter d'autres modificateurs d'histones (KMT, CBP/p300) ou enzymes de remodelage de la chromatine (complexes SWI/SNF, SPT6).

1.2.3. KDM6A, un gène suppresseur de tumeur ?

Des mutations de *KDM6A* sont fréquemment retrouvées dans de nombreux types de cancers (105) avec en tête d'entre eux le cancer de la vessie (>30 % des cas), et dans une moindre fréquence, certaines tumeurs hématopoïétiques comme les leucémies myélomonocytaires chroniques (106), les leucémies aigues lymphoblastiques (107) ou le myélome multiple (108). Les données de la littérature laissent suggérer un rôle suppresseur de tumeur de KDM6A.

Tout d'abord, il est retrouvé très majoritairement des mutations inactivatrices de *KDM6A*. Ces variants sont de type faux-sens (environ 30 % des cas), des délétions/insertions avec décalage du cadre de lecture (environ 14 % des cas) ou des mutations de type non-sens (environ 14 % des cas). Il n'existe pas de hotspot de mutation et des variants peuvent être retrouvés sur la totalité du gène (données COSMIC).

De plus, de nombreuses études fonctionnelles réalisées chez la drosophile ou dans des cellules tumorales humaines mettent en évidence les effets oncogéniques de la perte d'expression de *KDM6A*. Chez la drosophile, sa perte d'expression au sein de cellules présentant une activation anormale de la voie Notch conduit au développement d'une tumeur de la rétine (109). Dans le cancer du sein, KDM6A joue un rôle central dans l'inhibition de la transition épithélio-mésenchymateuse, processus

favorisant la dissémination des cellules tumorales épithéliales et la formation de métastases (110). Dans le cancer du pancréas, des études récentes ont observé que les patients porteurs d'une mutation de *KDM6A* avaient une survie globale raccourcie. Cette observation a été étayée par des essais fonctionnels sur des lignées montrant l'acquisition de traits phénotypiques d'agressivité lors de la perte d'expression de *KDM6A* (100,111). De manière intéressante, dans un des modèles de cancer du pancréas, l'apparition d'un phénotype agressif n'est observée que chez les souris femelles présentant un variant délétère homozygote de *KDM6A* ou chez les souris mâles ayant perdu l'expression à la fois de *KDM6A* et de *UTY* (111). Ainsi, si UTY n'est pas capable de compenser l'activité déméthylase de KDM6A en cas de perte de fonction de cette dernière, il pourrait être capable de la remplacer dans ses interactions avec les autres protéines.

En oncohématologie, la perte d'expression de *KDM6A* a été particulièrement étudiée dans les leucémies aigues lymphoblastiques T (LAL-T) et le myélome multiple. Dans les LAL-T avec surexpression de NOTCH1, l'inactivation de *KDM6A* accélère la progression de la tumeur (112,113). Les mutations de *KDM6A* seraient prédominantes chez les patients de sexe masculin. Comme cela a pu être observé dans le cancer du pancréas, l'expression de *KDM6A* par l'allèle sauvage chez les femmes en cas de mutation hétérozygote suffirait à empêcher le développement de la tumeur (114).

Dans le myélome multiple, une étude a mis en évidence un impact pronostic péjoratif des mutations de *KDM6A* sur la survie globale des patients (108). Ces données sont corroborées par des analyses fonctionnelles sur des lignées cellulaires de MM ayant montré que la perte d'expression de KDM6A entrainait une augmentation des capacités de prolifération, de clonogénicité, de tumorogénicité et d'adhérence des cellules tumorales. Ces observations étaient corrélées à des modifications du profil transcriptomique impliquant les processus de croissance cellulaire, mort cellulaire, mobilité cellulaire, cycle cellulaire, régulation de l'expression génique et signalisation intercellulaire (99).

1.2.4. Perspectives thérapeutiques

L'activité de KDM6A est antagoniste à celle du complexe PRC2. En se basant sur le concept de létalité synthétique, plusieurs études dans les LAL-T (114), le cancer de la vessie (115) et le myélome multiple (99,116) ont montré que la perte de fonction de KDM6A sensibilisait les cellules tumorales aux inhibiteurs d'EZH2. La létalité synthétique peut se définir dans ce contexte comme l'induction d'une mort cellulaire par la combinaison d'une mutation et de l'action d'un composé chimique alors que la mutation ou le composé pris séparément n'est pas létal. Le premier inhibiteur d'EZH2 à avoir été utilisé est la 3-déazaneplanocine A (DZNep) qui inhibe de manière peu spécifique la méthylation de H3K27. D'autres inhibiteurs plus spécifiques ont vu le jour à partir de 2012 tels que le GSK126, l'EPZ-005687 ou l'EPZ-6438 (tazemetostat). Ils fonctionnent par compétition avec le cofacteur d'EZH2, la S-adénosyl-méthionine. Ils ont d'abord été testés dans les cancers présentant des mutations activatrices d'EZH2 comme le lymphome B diffus à grandes cellules. Leur utilisation peut en fait être étendue aux tumeurs porteuses de mutations inactivatrices au niveau des protéines dont l'action est opposée à celle de PRC2 : composants du complexe SWI/SNF, KDM6A, CBP, EP300, etc. (117,118). Parmi les inhibiteurs existants, le tazemetostat a été particulièrement étudié parce qu'il présente une bonne biodisponibilité par voie orale. Il a montré une bonne efficacité dans des modèles précliniques de lymphomes B non hodgkiniens (119). Son efficacité et son innocuité sont actuellement évaluées dans des essais cliniques de phase I et II.

Une approche utilisant les inhibiteurs de protéines à bromodomaine BET (*Bromodomain and Extra Terminal*) (BETi) (111) a également été testée sur des lignées cellulaires de cancer du pancréas présentant une mutation de *KDM6A* avec une efficacité variable en fonction des lignées étudiées. Les protéines BET, comprenant BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT, modulent l'expression génique en régulant le contrôle de l'élongation transcriptionnelle par des éléments régulateurs distaux ou *enhancers* (120). Les BETi vont venir se fixer dans la poche des bromodomaines et empêcher ainsi leur recrutement au niveau des lysines acétylées. Les premières caractérisations des cibles transcriptionnelles des protéines BET faites dans des

hémopathies lymphoïdes pointaient une inhibition importante de *MYC* (121). Dans le cancer du pancréas, le rôle suppresseur de tumeur de KDM6A serait majoritairement indépendant de son activité déméthylase et serait dû, notamment, à une augmentation de la transcription de *MYC*. Cette observation présente un intérêt particulier puisqu'il a été montré qu'il y avait une surexpression de c-Myc dans la HCL et HCL-v associée à une sensibilité à l'inhibiteur de BET JQ-1 (122). Certains BETi ont été évalués ou sont en cours d'évaluation en phase 1 dans des lymphomes B non hodgkiniens (CC-95775, CPI-0610, ABBV-075, etc.).

Dans une autre étude portant toujours sur le cancer du pancréas, les auteurs ont montré une sensibilité accrue des cellules cancéreuses ayant perdu l'expression de KDM6A aux inhibiteurs d'histone désacétylases tels que le vorinostat (100). Le rationnel de l'utilisation d'HDACi pour traiter les tumeurs porteuses d'un variant délétère de *KDM6A* repose sur l'opposition existante entre la méthylation d'H3K27 par PRC2 et son acétylation par le complexe CBP/p300 dont l'activité est directement favorisée par KDM6A (Figure 7). Dans l'étude citée, les auteurs ont mis en évidence un défaut d'acétylation de différents promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs qui pourrait expliquer l'efficacité des HDACi. Plus largement, avec des variations en fonction du type de cancer, les HDACi sont capables d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et la mort cellulaire, de réduire l'angiogenèse et de moduler la réponse immune (123). Plusieurs HDACi possèdent une AMM dans diverses hémopathies. Le belinostat est ainsi utilisé dans les lymphomes T périphériques, la romidepsine dans les lymphomes T cutanés et le panobinostat dans le myélome multiple.

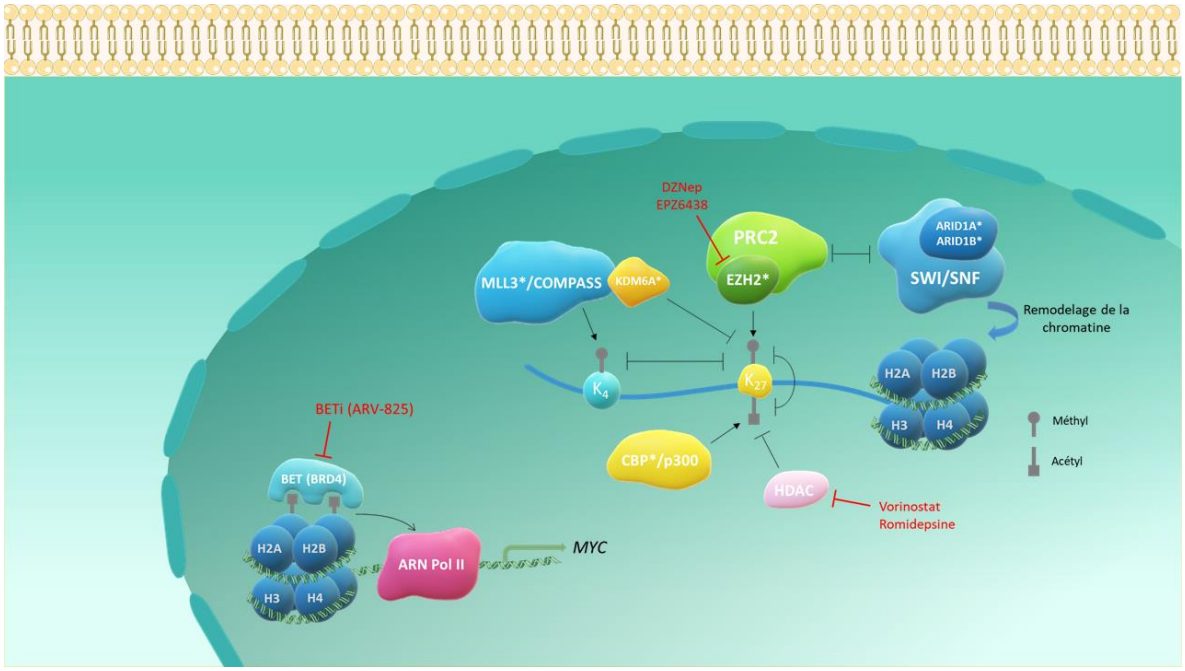


Figure 7 Régulation épigénétique de l'expression des gènes et cibles thérapeutiques (adapté de Xu et *al*., 2015 (117))
Intégration de KDM6A dans son environnement épigénétique : KDM6A favorise l'activation de la transcription génique par son activité déméthylante sur H3K27me3 et ses interactions positives avec les complexes MLL3, CBP et SWI/SNF. Ces différents acteurs ont une activité antagoniste au complexe PRC2 qui méthyle H3K27. Les gènes suivis d'un astérisque sont ceux que l'on retrouve fréquemment mutés dans la leucémie à tricholeucocyte et/ou sa forme variante.

1.3. Objectifs

Les conséquences fonctionnelles des modifications épigénétiques dans la leucémie à tricholeucocytes ne sont pas décrites dans la littérature. D'après les données disponibles dans d'autres types de cancer, KDM6A aurait un rôle de suppresseur de tumeur et sa perte d'expression permettrait l'utilisation de thérapies ciblées sur le principe de la létalité synthétique.

Les objectifs de ce projet étaient de caractériser l'implication de la perte d'expression de KDM6A dans la physiopathologie de la leucémie à tricholeucocytes et de sa forme variante et, dans un second temps, de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques : inhibiteurs d'EZH2, inhibiteurs de protéines BET et inhibiteurs d'histone désacétylases.

2. Matériels et méthodes

2.1. Lignées cellulaires

Les lignées JMV-3 et BONNA-12 sont commercialisées par le *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*. Leur caractérisation morphologique, phénotypique et génétique a été réalisée au sein de notre laboratoire lors d'une étude précédente.

La lignée JVM-3 a été établie à partir des cellules circulantes d'un patient de 73 ans atteint de leucémie à prolymphocytes B (124). L'analyse morphologique de la lignée JVM-3 a mis en évidence une population cellulaire de taille moyenne avec un cytoplasme abondant, basophile et présentant de fines villosités. Le noyau était régulier avec une chromatine fine renfermant un nucléole (Figure 8). L'analyse phénotypique des cellules a révélé une population homogène lymphoïde B mature présentant une expression forte du CD123, une positivité des marqueurs CD25 et CD11c et une négativité du CD103 (score HCL 3/4). L'analyse cytogénétique montrait un caryotype complexe tétraploïde de type masculin : 89-95<4n>,XXYY,der(2),+3,del(7q)x2,-10,+12,+add(12)(q25),-13,der(17). L'analyse par séquençage à haut débit avec le panel spécifique de la HCL (37) a mis en évidence deux variants d'intérêt. Le premier variant est situé dans le gène *BRAF* (NM_004333 :exon15 :c.A1803T-(p.K601N)) avec une fréquence allélique de 49,5 % compatible avec la délétion en 7q retrouvée sur 2 des 4 chromosomes 7, *BRAF* étant situé en 7q34. Le second variant est situé dans le gène *ARID1B* (NM_020732 :exon18 :c.C4304T-(p.P1435L)) avec une fréquence allélique de 25,3 % compatible avec la tétraploïdie. Ce variant est prédit peu pathogène par les algorithmes. Malgré son origine, les aspects cytologiques, phénotypiques et mutationnels décrits ci-dessus rapprochent davantage la lignée JVM-3 d'une lignée de HCL plutôt que de leucémie à prolymphocytes B. Ainsi, la mutation K601N du gène *BRAF* n'est pas une mutation classique des leucémies à prolymphocytes B. Elle semblerait se comporter *in vivo* de manière similaire à la mutation $BRAF^{V600E}$ dans le mélanome (125). La présence de la forme phosphorylée de ERK (pERK) dans cette lignée a été vérifiée par Western-blot et confirme l'activation anormale de la voie des

MAPK. D'autre part, l'expression du CD123 dans les leucémies à prolymphocytes B n'a jamais été rapportée dans la littérature.

La lignée BONNA-12 a été établie à partir des cellules spléniques d'un patient atteint de HCL (126). L'analyse morphologique de la lignée BONNA-12 a mis en évidence une population cellulaire de taille moyenne avec un cytoplasme étendu de basophilie modérée et présentant de fines villosités. Le noyau était régulier avec un nucléole proéminent (Figure 8). L'analyse phénotypique des cellules a révélé une population homogène lymphoïde B mature présentant une positivité du CD11c et une expression faible du CD25 et du CD123 et une négativité du CD103 (score HCL 3/4). L'analyse cytogénétique révélait un caryotype semblable à celui décrit en 1991: 47,X,-Y,+9,+12 [4]/47,sl,-9,+der(9)t(9,10),[10]. L'analyse par séquençage à haut débit a mis en évidence un variant d'intérêt localisé dans le gène *NOTCH1* (NM_017617:exon34:c.C7397T-(p.T2466M)). La fréquence allélique de 32,3 % était compatible avec la trisomie partielle du chromosome 9. Cette substitution localisée dans l'exon 34, dans le domaine de transactivation, a déjà été décrite dans COSMIC. D'après les auteurs ayant mis au point la lignée, les cellules immortalisées ont perdu certains marqueurs spécifiques aux HCL comme le CD25 et l'aspect cellulaire s'est modifié évoluant vers des cellules plus grandes avec une chromatine plus fine et nucléolée. Le statut mutationnel de *BRAF* chez le patient d'origine est inconnu. Soit la mutation était absente chez le patient, soit il y a eu immortalisation d'un sous-clone particulier n'ayant pas ou ayant perdu la mutation. En effet, le statut des chaines lourdes des immunoglobulines diffère entre le patient source et la lignée cellulaire (IgG3 vs IgM). Il semble ainsi raisonnable de penser que la lignée BONNA-12 se rapproche plus particulièrement d'une HCL-v.

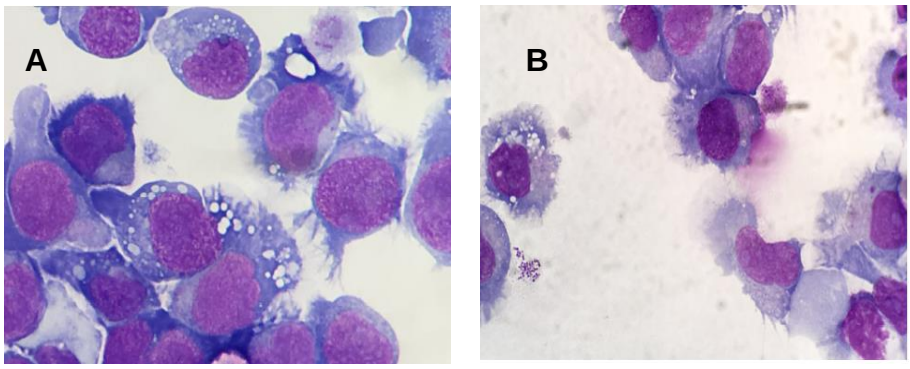


Figure 8 Aspect cytologique des lignées JVM-3 et BONNA-12
A : JVM-3
B : BONNA-12
Coloration au May-Grünwald Giemsa, x1000

Nous avons également travaillé sur la lignée CM qui est une lignée de cellules B immortalisées, mais non transformées, par le virus d'Epstein-Barr (EBV) (127). L'analyse phénotypique des cellules a confirmé leur caractère B avec une positivité des marqueurs B classiques, CD19 et CD20. Les cellules B sont polytypiques avec une répartition à parts égales entre les chaines légères kappa et lambda, compatible avec le caractère non transformé des cellules. D'autre part, la lignée CM ne présente pas d'anomalies phénotypiques notables.

2.2. Culture cellulaire

Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO_2 en atmosphère humide. Les lignées JVM-3 et CM ont été cultivées dans un milieu RPMI-1640 (Lonza) contenant 2 mM de L-glutamine, 1 % d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF 10 %, Eurobio) décomplémenté par la chaleur. Lors de leur première décongélation, les cellules ont été incubées dans un milieu de culture contenant des molécules inhibant les mycoplasmes (Mycokill AB®, PAA). Trois passages par semaine ont été effectués. Le comptage des cellules et la détermination de leur viabilité ont été réalisés par la méthode d'exclusion au bleu de Trypan sur des cellules de Malassez.

2.3. Modification génétique des cellules

2.3.1. Construction du système CRISPR-Cas9

Le système *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9* (CRISPR-Cas9) est une technologie dérivée d'un système de défense des bactéries contre les virus qui permet un clivage ciblé de l'ADN (128,129). Plusieurs éléments essentiels le constituent :

- La Cas9, une endonucléase qui va couper les deux brins de l'ADN cible ;
- Le CRISPR RNA (crRNA) qui va venir s'apparier sur une séquence cible de vingt nucléotides et conférer ainsi sa spécificité au système ;
- Le *trans-activating* crRNA (tracrRNA) qui a une fonction d'adaptateur permettant la formation du complexe Cas9/CRISPR RNA.

Le crRNA et le tracrRNA peuvent être regroupés pour former un ARN guide (sgRNA). Pour se fixer, le système CRISPR-Cas9 doit pouvoir reconnaitre un motif PAM (*Protospacer-Adjacent Motif*), souvent de type NGG (N étant un des quatre nucléotides), du côté 3' par rapport à la séquence cible. L'endonucléase va cliver l'ADN 3 nucléotides avant le motif PAM (Figure 9).

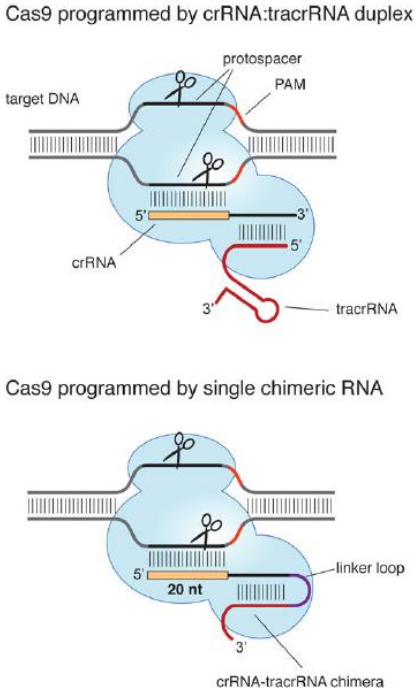


Figure 9 Structure du système CRISPR-Cas9 d'après Jinek et *al*., 2012 (128)
Le système CRISPR-Cas9 est constitué d'un ARN CRISPR (crRNA) dont la séquence est complémentaire de la séquence cible, d'une endonucléase Cas9 capable de cliver l'ADN double brin en amont d'un motif appelé PAM et d'un ARN adaptateur (tracrRNA) permettant de lier l'enzyme Cas9 à l'ARN CRISPR. L'association de l'ARN CRISPR et de l'ARN adaptateur forme l'ARN guide.

Deux systèmes de réparation des cassures double brin de l'ADN peuvent alors être mis en jeu (Figure 10) :

- La réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ), majoritaire, qui va permettre de rétablir la continuité de l'ADN mais en introduisant des erreurs : insertions et/ou délétions d'un ou plusieurs nucléotides ;
- La réparation par recombinaison homologue (HDR), plus fidèle mais moins rapide et utilisée de manière minoritaire par les cellules.

Le système CRISPR-Cas9, grâce à la mise en jeu du système de réparation NHEJ, va pouvoir induire l'inactivation de gènes par l'introduction de variants délétères.

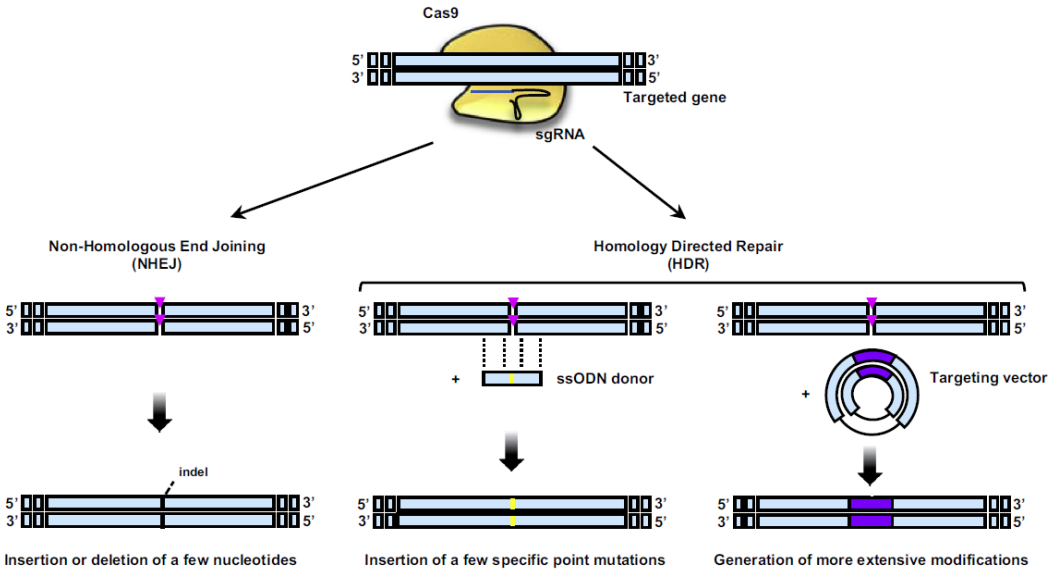


Figure 10 Le système CRISPR-Cas9 et la mise en jeu des systèmes de réparation des cassures double brin de l'ADN d'après Guernet & Grumolato, 2017 (129)
Le système NHEJ rétablit la continuité de l'ADN en introduisant des erreurs aléatoires. Le système HDR est plus fidèle mais mis en jeu de manière minoritaire. Il se sert d'un brin matrice pour rétablir la continuité de l'ADN. Si un brin matrice, appelé oligonucléotide donneur (ssODN), est introduit de manière artificielle dans la cellule, cela permet l'introduction ciblée de mutations ponctuelles.

L'extinction de l'expression de *KDM6A* dans la lignée JVM-3 a été réalisée avec une séquence cible située dans l'exon 4 du gène (Figure) décrite dans la littérature (99):

5'-CAGCATTATCTGCATACCAG-3'

La séquence du CRISPR RNA correspondante est la suivante :

5'-CAGCAUUAUCUGCAUACCAGGUUUUAGAGCTATGCT-3'

Des modifications chimiques sont effectuées sur le crRNA pour éviter sa dégradation par les RNases cellulaires.

La nucléase Cas9 (Alt-R® S.p. Cas9 Nuclease V3), le tracrRNA (Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA), *l'enhancer* (Alt-R® Cas9 Electroporation Enhancer) et le crRNA (Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA) sont fournis par Integrated DNA Technologies (IDT). Les différents éléments du système ont été assemblés selon le protocole du fournisseur « *Alt-R CRISPR-Cas9 System : Delivery of ribonucleoprotein complexes into HEK-293 cells using Amaxa® Nucleofector® System* ». Le tracrRNA et le crRNA ont été mélangés et incubés à 95°C pendant 5 min formant l'ARN guide. Le complexe

ribonucléoprotéique a été constitué en réalisant un mélange contenant du tampon phosphate salin (PBS), l'ARN guide et la nucléase Cas9. Ce mélange a été incubé 10 à 20 min à température ambiante. L'*enhancer* a ensuite été ajouté. C'est un ADN simple brin qui permet d'améliorer l'efficacité du système CRISPR-Cas9. Son mécanisme d'action réel est peu documenté par IDT. Le mélange réactionnel final contient 4,6 µM de sgRNA, 1 µM de nucléase Cas9 et 4 µM d'*enhancer*.

2.3.2. Transfection par électroporation

La transfection du système CRISPR-Cas9 a été réalisée par nucléofection. La technologie Nucleofector™ utilise une combinaison spécifique de paramètres électriques optimisés et de solutions adaptées à différents types de cellules qui permet le transfert des molécules directement dans le noyau cellulaire. Les membranes plasmiques sont perméabilisées par l'application d'un champ électrique, c'est ce qu'on appelle l'électroporation.

Les paramètres de transfection optimaux ont été déterminés à l'aide du kit *Amaxa™ 4D-Nucleofector™ Optimization Protocol* (Lonza). Trois solutions de transfection sont mises à disposition par le fournisseur : SF, SG et SE. La solution SF est celle habituellement utilisée pour les lymphocytes B. La composition de ces solutions n'est pas précisée par Lonza. Quinze paramètres électriques peuvent être associés à ces solutions. Les essais de transfection ont été réalisés en utilisant un plasmide d'expression codant pour la GFP (*Green Fluorescent Protein*) (*pmaxGFP™ Vector* (IDT)) permettant la détection des cellules par cytométrie.

Le protocole général de la transfection est présenté en annexe (Annexe 2). Dans ce protocole, deux variables peuvent être optimisées : la densité cellulaire et l'ajout d'une étape de récupération. La densité cellulaire recommandée par le fournisseur pour les cellules en suspension est de $3{,}2.10^5$ à $1{,}6.10^6$ cellules par puits. Elle influence la viabilité cellulaire et est à déterminer pour chaque type cellulaire. L'étape de récupération est une étape supplémentaire proposée par le fournisseur en cas de mort cellulaire importante. Elle consiste à ajouter du milieu cellulaire chauffé sur les cellules directement après la transfection et à les laisser reposer 10 min à 37°C avant leur transfert dans la plaque 96 puits.

La mesure de l'efficacité de transfection a été réalisée sur le NucleoCounter® NC-3000™ (ChemoMetec) selon le protocole de ChemoMetec « *GFP transfection efficiency assay using Hoechst 33342 and propidium iodide* ». L'Hoechst est un composé fluorescent utilisé pour marquer l'ADN de toutes les cellules. L'iodure de propidium, un intercalant de l'ADN fluorescent, marque uniquement les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, signe de mort cellulaire. La mesure simultanée de la fluorescence émise par la GFP, l'Hoechst et l'iodure de propidium par cytométrie permet de déterminer le pourcentage de cellules viables transfectées.

2.3.3. Surveyor® Nuclease Assay

Le *Surveyor® Mutation Detection Kit for Standard Gel Electrophoresis* (IDT) est un test permettant de vérifier l'efficacité du système CRISPR-Cas9. Ce test utilise une CEL I nucléase, qui clive l'ADN double brin du côté 3' en présence de mésappariements. L'expérience se déroule en plusieurs étapes (Figure 11) :

1. Extraction de l'ADN des cellules à l'aide du kit Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue (Annexe 3).
2. Réalisation d'une réaction de polymérisation en chaine (PCR) pour amplifier la région d'intérêt.
3. Dénaturation des produits de PCR et hybridation des brins pour former des homo- et des hétéroduplex.
4. Clivage des hétéroduplex par la nucléase.
5. Electrophorèse des fragments d'ADN sur un gel d'agarose.

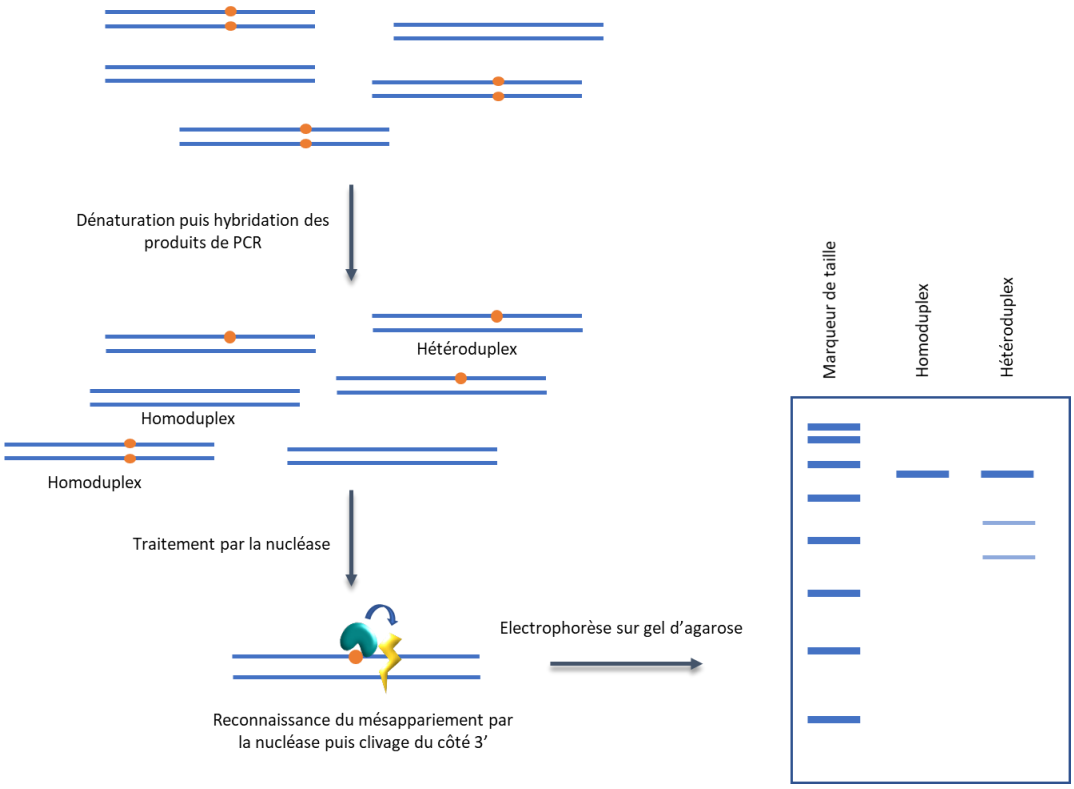


Figure 11 Principe du Surveyor® Nuclease Assay
Après amplification de la région d'intérêt, les produits de PCR sont dénaturés puis hybridés de manière aléatoire ce qui entraine la constitution d'homo- et hétéroduplex en présence de variants. La nucléase va venir ensuite cliver du côté 3' des mésappariements ainsi induits. Si des variants sont présents, trois bandes sont obtenues au lieu d'une seule.

Les amorces (Eurogentec) pour la PCR ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 (Version 0.4.0., http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) (Annexe 4).

L'étape d'amplification a été réalisée sur un thermocycleur MiniCycler™ (MJ Research). La migration a été effectuée dans un gel à 2 % d'agarose pendant 1h à 80V dans des cuves Bio-Rad reliées à un générateur Power PAC 300 (Bio-Rad). Les images de gel d'électrophorèse ont été obtenues avec l'imageur Chemidoc™ XRS (Bio-Rad). Le traitement des images a été réalisé sur le logiciel Image Lab (Bio-Rad). Les réactifs utilisés pour la PCR et l'électrophorèse sont regroupés dans le Tableau 2.

Tableau 2 Liste des réactifs utilisés pour la PCR et l'analyse des produits de PCR

Réactifs PCR	Fournisseur
Platinum Taq® DNA Polymerase	Invitrogen
$MgCl_2$ 50 mM	Invitrogen
10X PCR Buffer	Invitrogen
dNTP PCR Grade	Roche
Agarose Ultra Pure Electrophoresis Grade	Life Technologies
Bromure d'éthidium	Eurobio
50 bp DNA ladder	Carl Roth
6X *Blue Juice™ Gel Loading Buffer*	Invitrogen
TAE 10X	Sigma

2.3.4. Technique d'analyse de fragments

Les fragments de PCR ont été analysés pour confirmer la présence d'insertion(s) et/ou délétion(s) au niveau du site ciblé par le CRISPR-Cas9. Nous avons amplifié les fragments d'intérêt par PCR avec les mêmes amorces que celles utilisées pour le Surveyor® Nuclease Assay (Annexe 4). Nous avons ensuite ajouté aux produits de PCR du Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) et du GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems). Le formamide hautement déminéralisé sert à la mise en suspension des échantillons avant leur injection dans le système d'électrophorèse capillaire. Le GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard est un contrôle interne permettant de déterminer la taille de fragments mesurant 20 paires de base (pb) à 600 pb. Les échantillons ont ensuite été analysés sur un séquenceur capillaire ABI3500® permettant la séparation de fragments différant par au moins un nucléotide.

2.3.5. Séquençage à haut débit

L'ADN des cellules a été extrait des cellules à l'aide du kit Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue (Annexe 3). 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.

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). Les librairies ont été préparées

avec le kit Ion AmpliSeq™ Library (ThermoFisher Scientific) selon les recommandations du fabriquant. 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 fabriquant. 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), l'enrichissement et le dépôt sur la puce à semi-conducteur. La puce utilisée pour l'analyse de l'ADN des lignées était une puce Ion 316™ Chip (produisant en moyenne 320 Mb et 2-3 millions de reads/puce pour une longueur moyenne de read de 112 pb). Le séquençage à haut débit a été réalisé sur l'appareil Personal Genome Machine® (PGM) de Ion Torrent (ThermoFisher Scientific).

L'analyse primaire et secondaire des données a été réalisée sur Integrative Genomics Viewer (IGV) : exploitation du signal, rapport de séquençage et contrôle de qualité, alignement des lectures contre la séquence de référence (génome humain version GRCh37/hg19), recherche de variants et d'insertion ou délétions.

2.3.6. Clonage

Nous avons utilisé deux techniques pour cloner les cellules JVM-3 modifiées afin d'obtenir une population clonale n'exprimant pas *KDM6A*. La première technique est la dilution limite. Nous avons réalisé des dilutions en série d'une suspension cellulaire que nous avons ensuite ensemencée dans trois plaques 96 puits (Sarstedt). Les dilutions ont été réalisées de façon à avoir statistiquement 1 cellule par puits. Les cellules ont été incubées dans du milieu RPMI-1640 (Lonza) contenant 20 % de SVF (Eurobio) pendant 3 semaines dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO_2 en atmosphère humide.

Nous avons également ensemencé des cellules sur de la méthylcellulose, un milieu semi-solide permettant l'isolement des cellules et leur croissance. Une dizaine de

cellules ont été ensemencées par puits d'une plaque 6 puits, dans 1,1 mL de MethoCult® (STEMCELL Technologies). La plaque a été incubée pendant 3 semaines dans un incubateur à 37°C et 5 % de CO_2 en atmosphère humide. Les colonies isolées ont été ensuite prélevées à la pipette, sous un microscope et remises en culture dans leur milieu de culture en suspension habituel. Les cellules ont été transférées progressivement dans des volumes de culture plus importants.

2.4. Analyses fonctionnelles

Les cellules sont stimulées la veille des expérimentations par un passage au demi afin qu'elles soient en phase exponentielle de croissance.

2.4.1. Prolifération cellulaire

Les cellules ont été ensemencées à la densité de 10^5 cellules par puits dans une plaque 24 puits (Sarstedt) contenant 2 mL de milieu culture avec 1 % ou 10 % de SVF. La prolifération a été étudiée sur 13 jours pour le SVF 10 % et sur 6 jours pour le SVF 1 %. Le comptage des cellules et la détermination de leur viabilité ont été réalisés par la méthode d'exclusion au bleu de Trypan sur des cellules de Malassez. La mesure a été réalisée en triplicat.

2.4.2. Adhérence à la fibronectine

Les cellules ont été lavées puis incubées avec de la calcéine AM (kit *Vybrant™ Cellules Adhesion Assay Kit, V-13181)* qui produit un composé fluorescent une fois clivée par les estérases cellulaires. Une plaque 96 puits (Sarstedt) recouverte de fibronectine (Sigma) a été ensemencée avec 5.10^5 cellules par puits et incubée 2 h à 37°C. L'absorbance des différents puits a été mesurée à 490 nm avec le lecteur de microplaques Victor X4 (PerkinElmer) avant lavage et après lavage des puits au PBS. Le lavage permet l'élimination des cellules non adhérentes. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de cellules présentes.

2.4.3. Test MTS

Les cellules ont été ensemencées à la densité de 10^5 cellules par puits dans une plaque 96 puits (Sarstedt) puis incubées pendant 72 h en présence de concentrations croissantes de la molécule à tester. Un contrôle avec 0,01 % de diméthylsulfoxyde

(DMSO) a été systématiquement réalisé. Au temps 72 h, 20 µL de réactif CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) ont été ajoutés à chaque puits. Une incubation de 4 h à 37°C a été réalisée. Le réactif CellTiter96® de couleur jaune contient un sel de tétrazolium qui est réduit en un produit brun, le formazan, par la succinate déshydrogénase mitochondriale active dans les cellules vivantes. La quantité de précipité brun formé est ainsi proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. L'absorbance des puits a été mesurée à 490 nm à l'aide du lecteur de microplaques Victor X4 (Perkin Elmer). La concentration de la molécule capable d'induire la mort de 50 % des cellules, appelée CI_{50}, a été déterminée à l'aide du logiciel Prism® (version 6) de GraphPad.

Pour le tazemetostat, un inhibiteur d'EZH2, nous avons modifié le protocole d'évaluation de la sensibilité, l'effet du traitement étant plus long à apparaitre. Nous avons cultivé les cellules avec différentes concentrations de tazemetostat pendant 9 jours avant la réalisation du test MTS. Les différentes molécules ainsi que les gammes de concentration utilisées sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 Molécules thérapeutiques testées avec leur gamme de concentrations

Molécule	Référence fabriquant	Mécanisme d'action	Gamme CI50
Cladribine (Litak®)	Lipomed	Analogue de purine	0,001 µM ; 0,01 µM ; 0,1 µM ; 1 µM ; 10 µM ; 20 µM ; 40 µM
Vémurafénib (PLX4032, RG7204)	Selleckchem SE-S1267	Inhibiteur de BRAF	0,001 µM ; 0,01 µM ; 0,1 µM ; 1 µM ; 12,5 µM ; 25 µM ; 50 µM
Doxorubicine	Sandoz	Anthracycline	0,000 5µM ; 0,005 µM ; 0,05 µM ; 0,5 µM ; 1 µM ; 5 µM ; 10µM
Tazemetostat (EPZ-6438)	Selleckchem SE-S7128	Inhibiteur d'EZH2	0,01 µM ; 0,1 µM ; 1 µM ; 10 µM ; 20 µM
ARV-825	MedChemExpress HY-16954	Inhibiteur de BET	0,005 µM ; 0,01 µM ; 0,02 µM ; 0,05 µM ; 0,1 µM ; 1 µM ; 5 µM
Romidepsine	MedChemExpress HY-15149	Inhibiteur d'HDAC	0,0002 µM ; 0,002 µM ; 0,02 µM ; 0,2 µM ; 2 µM ; 10 µM ; 20µM

2.5. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse combinant des systèmes de fluidique et d'optique. Elle permet l'analyse de l'expression des antigènes membranaires et/ou intracytoplasmiques des cellules. Pour ce faire, les cellules sont incubées avec des anticorps couplés à des fluorochromes et ciblant divers antigènes appelés CD (Cluster de Différenciation). Les cellules sont maintenues dans une gaine liquide et passent une par une devant un faisceau laser qui permet l'excitation des fluorochromes. La détection des photons et la transformation en signal électrique par des photomultiplicateurs permet l'analyse des résultats en termes de pourcentage de cellules positives c'est-à-dire dépassant un certain seuil de fluorescence. Un marqueur est positif quand la proportion de cellules marquées est supérieure à 20 %. L'intensité du marquage est définie par la médiane de fluorescence.

Les anticorps utilisés ainsi que leur volume sont indiqués dans le Tableau 4. À ces anticorps sont ajoutés 50 µL de suspension cellulaire à une concentration de 10^6 cellules/mL. Les préparations ont été incubées une demi-heure à l'abri de la lumière à température ambiante. L'excès d'anticorps a été lavé sur l'appareil lyse/lavage BD FACS® (Becton Dickinson) avec le protocole Wash Only™. Le réglage des PMT, compensations et la matrice d'analyse sont réalisés en routine dans le laboratoire d'hématologie du CHU de Caen. L'appareil a été standardisé selon les recommandations France Flow (billes de standardisation *Rainbow* 8 pics, Becton Dickinson). L'analyse des cellules a été réalisée sur le cytomètre en flux BD FACS CANTO II, 8 couleurs (Becton Dickinson). L'analyse des données a été réalisée sur le logiciel DIVA® (Becton Dickinson). Les histogrammes comparatifs d'expression des marqueurs ont été réalisés dans un second temps sur le logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

Tableau 4 Liste des anticorps utilisés pour l'analyse de cytométrie en flux
Abréviations : APC : allophycocyanine, APC-H7 : allophycocyanine hilite 7, BD : Becton Dickinson, CD : cluster de différenciation, Cy7 : cyanine 7, Cy5,5 : cyanine 5,5, FITC : fluoresceine isothiocyanate, PE : phycoerythrine, PerCp : peridin chlorophyll protein complex

Fluorochrome	Volume	Tube 1	Tube 2	Tube 3
FITC	10 µL	CD43 (1G10), BD	Kappa, Dako	CD103 (BerACT8), BD
PE	10 µL	CD23 (EBVCS,5), BD	Lambda, Dako	CD123 (9F5), BD
PECy7	10 µL	CD19 (5J25C1), BD	CD19 (5J25C1), BD	CD19 (5J25C1), BD
PerCpCy5,5	10 µL	CD5 (L17F12), BD	CD5 (L17F12), BD	CD27 (L128), BD
APC-H7	2,5 µL	X	CD20 (L27), BD	X
V421	2,5 µL	X	X	CD11c (Bly6), BD
APC	2,5 µL	CD79b (SN8), BD	CD10 (HI10), BD	CD25 (2A3), BD
V450	2,5 µL	FMC7 (P3NS1), BD	CD38 (HB7) BD	X
V500	2,5 µL	CD45 (Hi30), BD	CD45 (Hi30), BD	CD45 (Hi30)

2.6. Immunoblot

Les protéines ont été extraites à partir d'un culot sec contenant entre 5 et 10 millions de cellules à l'aide du tampon d'extraction M-PER™ (*Mammalian Protein Extraction Reagent, ThermoFisher Scientific*). Pour l'extraction plus spécifiquement des protéines nucléaires, un tampon d'extraction RIPA a été utilisé dont la composition est détaillée dans le Tableau 5. Des inhibiteurs de protéases (*Protease inhibitor cocktail*, Cell Signaling Tech.) et de phosphatases (Halt™, ThermoFisher Scientific) ont été ajoutés dans les tampons M-PER™ et RIPA. Les protéines ont ensuite été dosées sur un spectromètre à 595 nm (SmartSpec 3000™, Bio-Rad) par la méthode de Bradford avec le réactif Protein Assay (Bio-Rad).

Tableau 5 Composants du tampon d'extraction RIPA

Produit	Concentration initiale	Concentration finale
Tris-HCL pH 8,0	5 M	50 mM
NaCl	5 M	150 mM
Solution de dodécylsulfate de sodium (SDS)	10 %	0,1 %
Désoxycholate de sodium	10 %	0,5 %
NP-40	10 %	1 %

Trente microgrammes de protéines ont été déposés sur un gel de polyacrylamide pré-coulé 4-15 % (*Mini-Protean TGX 4-15%,* Bio-Rad). Le marqueur de taille, *Precision Plus Protein All Blue Standards* (Bio-Rad), a été déposé en parallèle. L'électrophorèse a été effectuée pendant 1h10 à 120 V. Le transfert en milieu semi-liquide sur membrane de nitrocellulose (Trans*-Blot Turbo Transfer Pack 0,2µm Nitrocellulose Mini*, Bio-Rad) a été réalisé sur l'appareil *TransBlot® Turbo™ Transfer System* (Bio-Rad) pendant 3 min à 25 V. La saturation de la membrane a été effectuée grâce à un tampon de blocage TBS-Tween contenant 3 % de sérumalbumine bovine (Sigma) ou 5 % de lait en fonction de l'anticorps primaire utilisé (Tableau 6), pendant 1h à température ambiante. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C ou une à deux heures à température ambiante, puis pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé à la peroxydase de raifort (HRP). La révélation de l'anticorps secondaire a été réalisée avec le kit Western Lightning Plus-ECL® (PerkinElmer). Ce kit contient du luminol, substrat de la HRP. La réaction d'oxydoréduction qui s'en suit entraine la production de lumière. C'est le phénomène de chimiluminescence. Les images ont été obtenues avec l'imageur Chemidoc™ XRS (Bio-Rad). Le traitement des images a été réalisé sur le logiciel Image Lab (Bio-Rad).

Tableau 6 Anticorps utilisés pour les immunoblots

Anticorps primaires	Taille attendue	Spécificité	Référence fabriquant	Facteur de dilution	Diluant
Anti-EZH2	98 kDa	Monoclonal de souris	Cell Signaling 3147	1/500ème	TBS-Tween Lait 5%
Anti-BTK	76 kDa	Monoclonal de lapin	Abcam Ab32555	1/1000ème	TBS-Tween Lait 5%
Anti-pBTK	76 kDa	Monoclonal de lapin	Abcam Ab68217	1/1000ème	TBS-Tween BSA 3%
Anti-CDK6	40 kDa	Polyclonal de lapin	Santa Cruz Biotechnology sc-177	1/1000ème	TBS-Tween BSA 3%
Anti-AKT	60 kDa	Polyclonal de lapin	Cell Signaling 9272S	1/1000ème	TBS-Tween BSA 3%
Anti-pAKT (Thr308)	60 kDa	Polyclonal de lapin	Cell Signaling 9275S	1/500ème	TBS-Tween BSA 3%
Anti-ERK	42/44 kDa	Monoclonal de lapin	Cell Signaling 4695S	1/2000ème	TBS-Tween BSA 3%
Anti-pERK	42/44 kDa	Monoclonal de lapin	Cell Signaling 4370S	1/2000ème	TBS-Tween BSA 3%
Anti-B-actine	43 kDa	Monoclonal de lapin	Cell Signaling 4970	1/2000ème	TBS-Tween Lait 5%
Anti-IKBα	35 kDa	Monoclonal de lapin	Abcam Ab32518	1/1000ème	TBS-Tween Lait 5%
Anti-H3K27me3	17 kDa	Polyclonal de lapin	Millipore 07-449	1/1000ème	TBS-Tween Lait 5%
Survivine	17 kDa	Polyclonal de lapin	Abcam ab469	1/1000ème	TBS-Tween Lait 5%
UTX	180 kDa	Polyclonal de lapin	Cell Signaling 33510	/	/
UTX	154 kDa	Polyclonal de lapin	GeneTex 121246	/	/
Anticorps secondaires	**Taille attendue**	**Spécificité**	**Référence fabriquant**	**Facteur de dilution**	**Diluant**
Anti-lapin	-	Polyclonal couplé HRP	Abcam	1/20000ème	TBS-Tween Lait 5% ou BSA 3%
Anti-souris	-				

3. Résultats

3.1. Transfection

3.1.1. Lignée JVM-3

La transfection de la lignée JVM-3 a été réalisée par nucléofection. Trois solutions de transfection ont été utilisées associées aux 15 conditions de transfection afin de choisir la combinaison permettant l'obtention du nombre le plus élevé de cellules viables transfectées. Suite à ces premiers tests, 4 conditions ont été choisies pour réaliser des analyses complémentaires : SF/CA-137, SF/CM-138, SG/CA-137 et SG/CM-150 (Figure 12).

Nous avons reproduit l'expérimentation à plusieurs reprises en faisant varier la densité cellulaire et en ajoutant une étape de récupération. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les conditions SF/CA-137 et SG/CM-150, une densité de 1.10^5 cellules par puits et une étape de récupération.

Nous avons transfecté le système CRISPR-Cas9 dans les conditions précisées précédemment. Nous avons obtenu 36% de cellules viables transfectées avec le couple SF/CM-138 et 44% avec le couple SG/CM-150. Les résultats étant proches pour les deux conditions, nous avons conservé la solution SF pour la suite des expérimentations, cette solution étant celle couramment utilisée au sein de notre laboratoire et, plus généralement, pour les lymphocytes B.

Nous avons obtenu un résultat reproductible pour les deux transfections avec le système CRISPR-Cas9 qui ont été faites ultérieurement avec 38% et 36% de cellules viables transfectées.

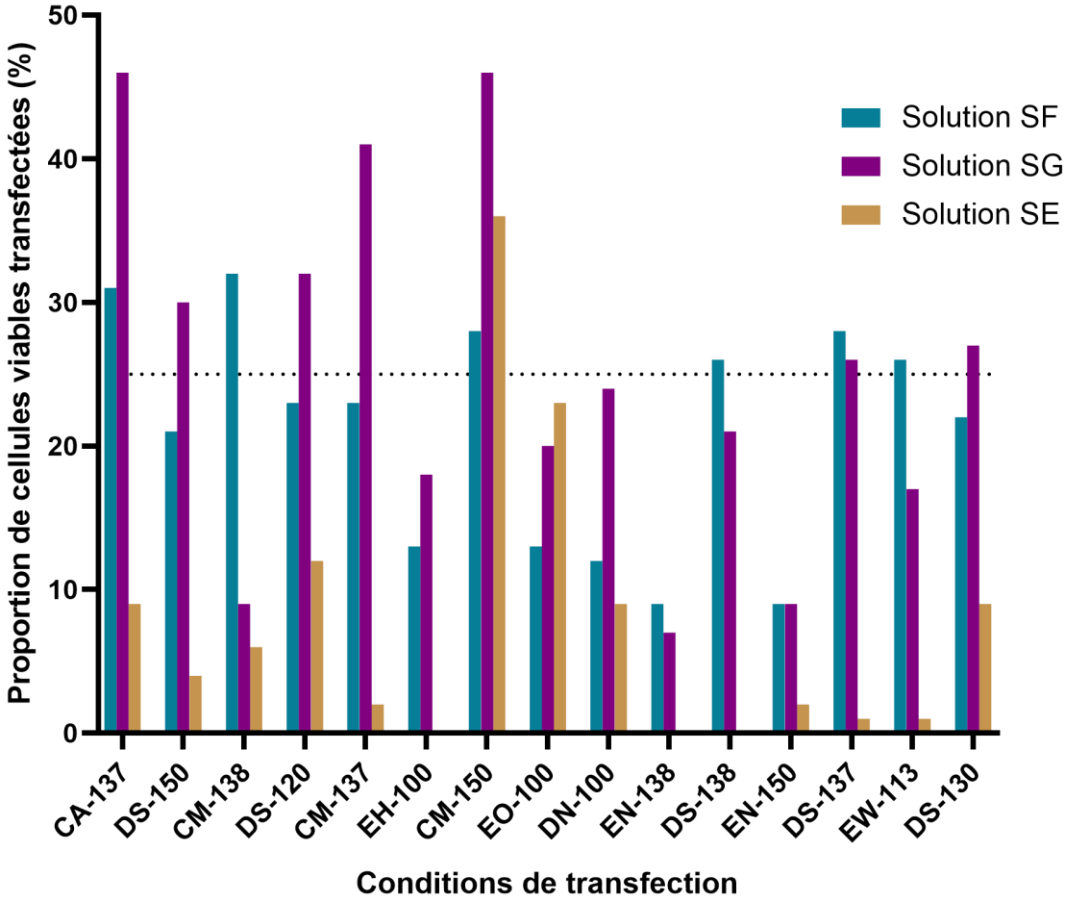


Figure 12 Efficacité de transfection de la lignée JVM-3
Les cellules ont été transfectées avec un plasmide d'expression pour la GFP par la technique de nucléofection puis incubées 72h à 37°C. La mesure de la viabilité cellulaire et du pourcentage de cellules transfectées a été réalisée par cytométrie sur un Nucleocounter® grâce à la détection combinée de la fluorescence émise par la GFP et les marqueurs de l'ADN, l'Hoechst et l'iodure de propidium.

3.1.2. Lignée BONNA-12

Les mêmes tests que sur la lignée JVM-3 ont été réalisés sur la lignée BONNA-12. Aucune des conditions expérimentées n'a permis de dépasser les 10 % de cellules viables transfectées. Ce pourcentage était trop faible pour réaliser la transfection du système CRISPR-Cas9.

3.1.3. Lignée CM

La transfection de la lignée CM a été réalisée par nucléofection. La solution SF a été privilégiée et 14 conditions de transfection ont été testées afin de choisir la combinaison permettant l'obtention du nombre le plus élevé de cellules viables transfectées (Figure 13). L'expérimentation a été reproduit avec les meilleures conditions EH-100, DN-100 et EN-150 avec l'obtention de résultats reproductibles.

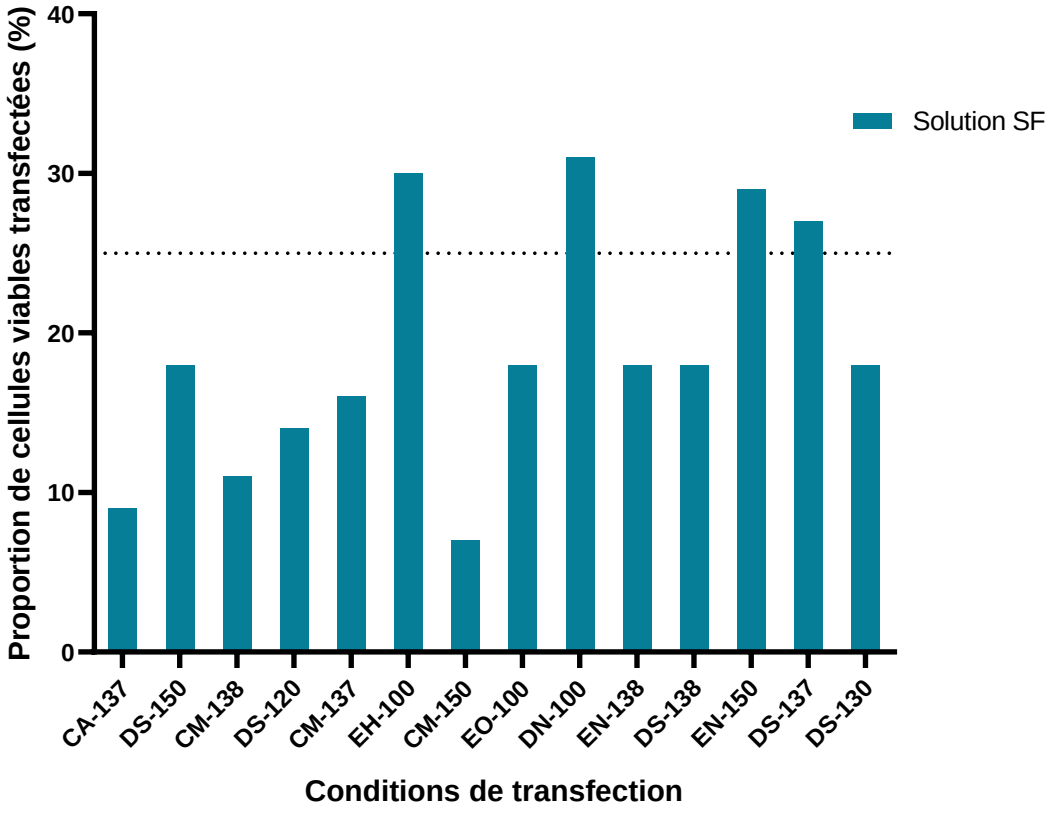


Figure 13 Efficacité de transfection de la lignée CM
Les cellules ont été transfectées avec un plasmide d'expression pour la GFP par la technique de nucléofection puis incubées 72h à 37°C. La mesure de la viabilité cellulaire et du pourcentage de cellules transfectées a été réalisée par cytométrie sur un Nucleocounter® grâce à la détection combinée de la fluorescence émise par la GFP et les marqueurs de l'ADN, l'Hoechst et l'iodure de propidium.

3.2. Analyse génétique

Afin de confirmer l'efficacité du système CRISPR-Cas9 dans nos cellules, nous avons réalisé un Surveyor® Nuclease assay, une analyse de fragments et un séquençage ciblé de *KDM6A* par séquençage à haut débit.

Le Surveyor® Nuclease Assay a été réalisé après chaque transfection avec le système CRISPR-Cas9. Les résultats ont permis de confirmer l'introduction et l'activité du système CRISPR-Cas9 au sein de la population cellulaire par la visualisation de bandes additionnelles à l'électrophorèse dans la piste contenant l'ADN des cellules transfectées (Figure 14). L'apparition de ces bandes traduit le mésappariement des brins d'ADN dû à l'introduction de variants. Ce test ne permet cependant pas de quantifier le nombre de cellules modifiées et de caractériser les variants introduits.

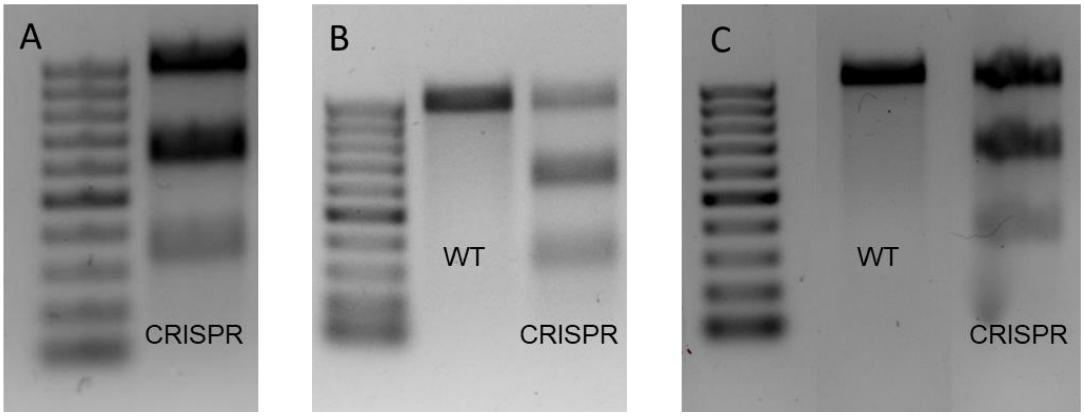


Figure 14 Résultats du Surveyor® Nuclease Assay
L'ADN des lignées a été extrait. Une PCR a été réalisée avec des amorces encadrant la zone ciblée par l'ARN guide. Une migration des produits de PCR a été réalisée sur gel d'agarose à 2% pour confirmer l'amplification du fragment ciblé. Les produits de PCR ont été dénaturés puis réhybridés afin de former des homo- et hétéroduplex qui ont été traités avec la nucléase. Les produits de PCR digérés ont été mis à migrer sur un gel d'agarose à 2 %. La présence de 3 fragments sur le gel traduit la présence d'hétéroduplex qui ont été clivés par la nucléase. Ces hétéroduplex sont présents uniquement si le système CRISPR-Cas9 a introduit des variants dans le gène *KDM6A*. Cela nous permet de confirmer l'activité du système dans les 3 cas analysés.
A : Analyse du 28/02/2019 B : Analyse du 26/03/2019 C : Analyse du 16/07/2019
Abréviations : WT : lignée JVM-3 sauvage, non transfectée ; CRISPR : lignée JVM-3 transfectée avec le système CRISPR-Cas9.

La technique d'analyse de fragments permet de visualiser la présence de fragments dont la taille diffère par un nucléotide ou plus. Cette analyse nous a permis de confirmer la présence d'insertions /délétions au niveau du site ciblé par le système CRISPR-Cas9 (Figure 15). Nous avons pu observer, dans la population transfectée, la présence de fragments additionnels au fragment de la longueur attendue. Les anomalies introduites sont principalement des délétions.

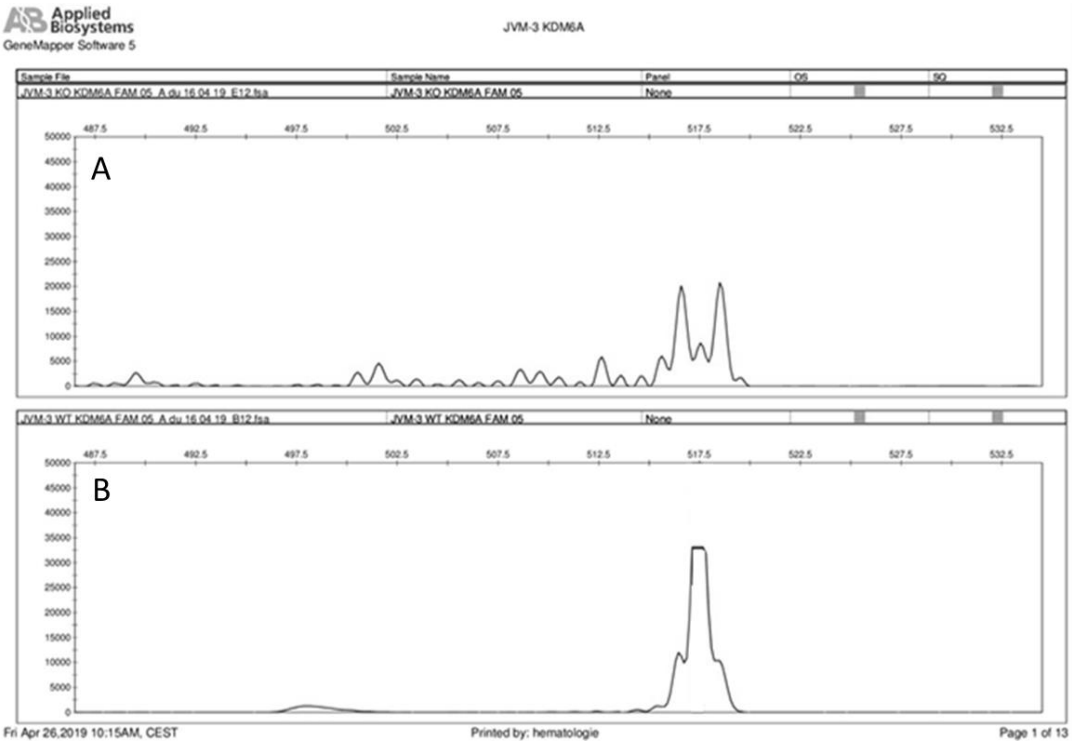


Figure 15 Résultats de l'analyse de fragments sur séquenceur capillaire
L'ADN des cellules a été extrait. Une PCR a été réalisée avec des amorces encadrant la zone ciblée par l'ARN guide. Une migration des produits de PCR a été réalisée sur gel d'agarose à 2 % pour confirmer l'amplification du fragment ciblé. Les produits de PCR ont été mélangés avec un contrôle interne et injectés dans le séquenceur capillaire. Le temps de sortie des fragments détermine leur taille. Des pics supplémentaires traduisant des tailles de fragment différentes sont observés sur le graphe de la lignée JVM-3 transfectée avec le système CRISPR-Cas9 (A) par rapport à la lignée JVM-3 non transfectée (B).

L'exon 4 du gène *KDM6A* ciblé par le système CRISPR-Cas9 a été séquencé par technique de séquençage à haut débit. La quasi-totalité des reads obtenus présentait une délétion, parfois de grande ampleur (jusqu'à 30 pb) ou, plus rarement, une insertion de quelques nucléotides (1 à 3) (Figure 16).

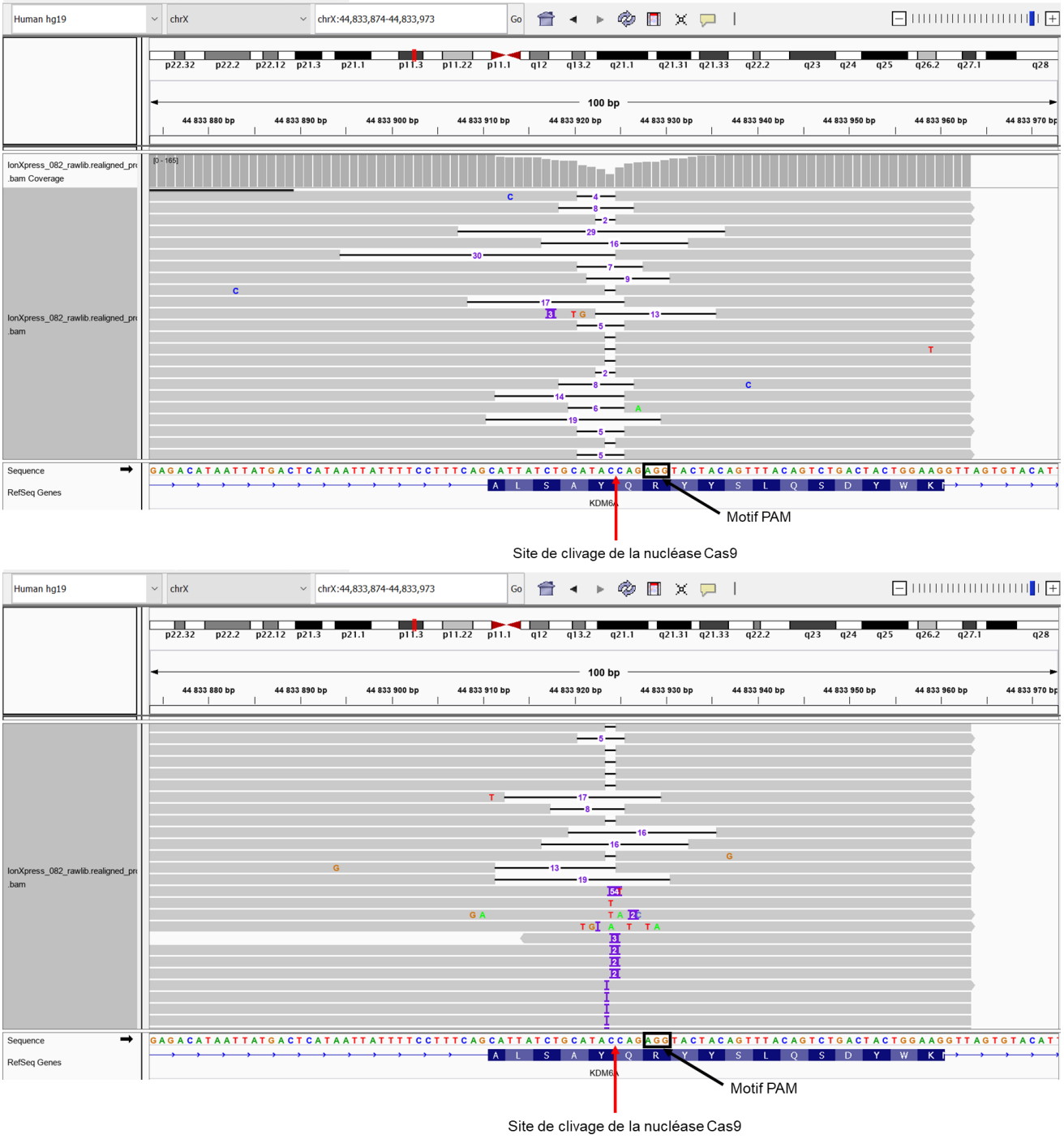


Figure 16 Résultats du séquençage de KDM6A par technique haut débit
Les régions cibles de l'ADN ont été amplifiées avec le kit Ion AmpliSeq™ Library (ThermoFisher Scientific). Après ligation des séquences adaptatrices et des séquences spécifiques de l'échantillon (« code-barre »), la librairie a été purifiée par capture sur billes magnétiques. La matrice de séquençage a été préparée par l'automate IonChef™ (kit Hi-Q View Chef™) permettant une amplification clonale dans des microréacteurs (émulsion), l'enrichissement et le dépôt sur la puce à semi-conducteur. Le séquençage à haut débit a été réalisé sur l'appareil Personal Genome Machine® (PGM) de Ion Torrent (ThermoFisher Scientific). L'analyse primaire et secondaire des données a été réalisée sur Integrative Genomics Viewer (IGV).

Les trois techniques d'analyse génétique utilisées ont permis de confirmer l'activité du système CRISPR-Cas9 au niveau du site de clivage de la nucléase Cas9, trois nucléotides en amont du motif PAM, AGG. Comme attendu, des insertions et délétions de nucléotides ont eu lieu entrainant, pour la plupart, un décalage du cadre de lecture délétère pour l'expression de la protéine.

3.3. Clonage

Le clonage en milieu liquide a été réalisé à deux reprises mais aucune colonie ne s'est formée. Le clonage en milieu semi-solide a permis d'isoler un clone. Ce clone est caractérisé par une délétion de 24 nucléotides avec une fréquence allélique de 100 %. Cependant, cette délétion est un multiple de trois et n'entraine donc pas de décalage du cadre de lecture. Les conséquences sur l'expression et/ou l'activité de la protéine KDM6A sont donc incertaines et n'ont pas encore été caractérisées.

3.4. La perte d'expression de KDM6A promeut l'activation de la voie des MAP-kinases et l'expression de la survivine associées à une meilleure résistance des cellules en milieu pauvre en nutriments

La voie des MAP-kinases, dérégulée par des anomalies génétiques touchant les gènes *BRAF* ou *MAP2K1*, joue un rôle central dans la physiopathologie de la HCL et de la HCL-v. La lignée JVM-3 possède une mutation alternative de *BRAF*, la K601N, entrainant une activation constitutive de la voie mise en évidence par la phosphorylation de ERK. Nous avons étudié l'intensité de cette phosphorylation avant et après édition du gène *KDM6A*. Nous avons pu observer une augmentation nette de la phosphorylation de ERK dans les cellules mutées suggérant que la perte d'expression de KDM6A pourrait potentialiser l'activation de la voie des MAP-kinases (Figure 17).

La voie du BCR joue un rôle central dans l'homéostasie du lymphocyte B et est impliquée dans la physiopathologie de nombreuses hémopathies lymphoïdes B dont la leucémie à tricholeucocytes (41,42,46). Pour étudier l'activation de la voie du BCR, nous avons regardé l'état de phosphorylation de BTK, kinase située relativement en amont de la voie, et de la sérine/thréonine kinase AKT activée *via* l'action du PI3K, et

l'intensité d'expression d'IKB-α, un inhibiteur de la voie canonique de NF-κB. Nous n'avons pas observé de modulation d'expression de ces protéines avant et après édition par le système CRISPR-Cas9 sur les cellules JVM-3 analysées (Figure 17). La voie du BCR semble activée de manière constitutive dans notre lignée et la suppression de l'expression de *KDM6A* ne semble pas favoriser davantage son activation.

KDM6A étant une déméthylase spécifique de H3K27me3, nous avons regardé si sa perte d'expression entrainait une augmentation du taux global de méthylation de H3K27. Nous nous sommes assurés en parallèle que l'expression d'EZH2, qui méthyle H3K27, n'était pas modifiée après édition par le système CRISPR-Cas9. Nous n'avons pas observé de différence de méthylation entre les cellules JVM-3 sauvages et mutées (Figure 17). En fonction du type tumoral, la modulation de la méthylation peut être plus ou moins visible au niveau global mais semblerait dans la majorité des cas loci-spécifique (99).

Nous avons également étudié l'expression de la survivine. La survivine appartient à la famille des IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) et régule le cycle et la mort cellulaires (130). Nous avons observé une expression de la survivine plus importante dans la lignée JVM-3 éditée ce qui pourrait favoriser la survie des cellules (Figure 17).

L'évaluation de l'expression de KDM6A par western-blot n'a pas pu être réalisée pour l'instant. Deux anticorps ont été testés, l'anticorps GTX121246 de GeneTex et l'anticorps 33510 de Cell Signaling Technology®. Ces deux anticorps étaient mentionnés dans la littérature. De nombreux essais ont été réalisés en faisant varier les tampons d'extraction, de blocage et d'incubation, la concentration en anticorps primaire, les temps et température d'incubation, sans résultats probants (Figure 18). Des tests complémentaires doivent être réalisés avec des contrôles fournis par Cell Signaling Technology® et un protocole de transfert des protéines sur l'appareil *TransBlot® Turbo™ Transfer System* (Bio-Rad) légèrement différent.

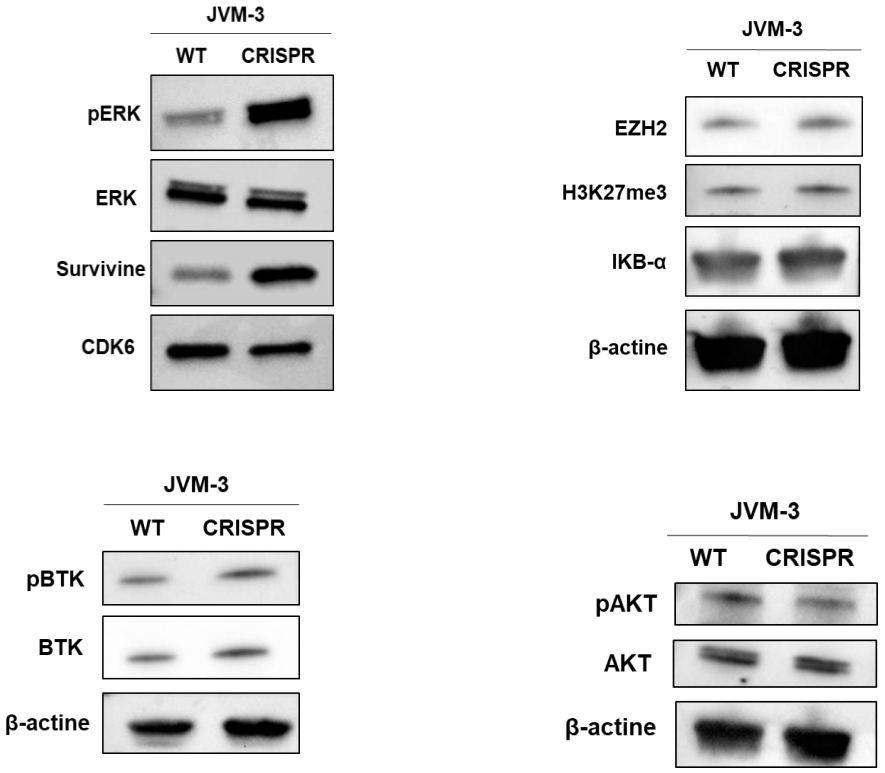


Figure 17 Analyse par Western-blot des extraits protéiques des lignées JVM-3 sauvage (WT) et éditée (CRISPR) incubés avec les anticorps indiqués.
La β-actine et la CDK6 servent de contrôle interne.

Anticorps UTX GeneTex 121246 **Anticorps UTX Cell Signaling 33510**

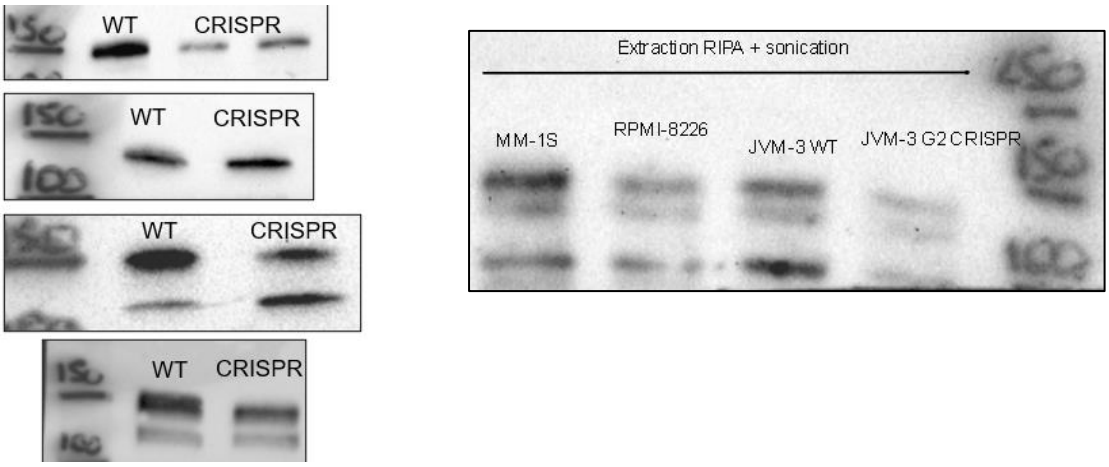


Figure 18 Analyse par Western-blot des extraits protéiques des lignées JVM-3 sauvage (WT) et éditée (CRISPR) incubés avec deux anticorps dirigés contre KDM6A (UTX)
La lignée MM-1S sert de contrôle positif et la lignée RPMI-8226, de contrôle négatif.

Les capacités de prolifération de la lignée JVM-3 sauvage et éditée dans des conditions de culture optimales ou réduites en nutriments ont été évaluées. Nous avons observé une meilleure résistance des cellules ayant perdu l'expression de KDM6A à la restriction nutritive par rapport aux cellules sauvages (p=0,0014 à J4, test de Student) (Figure 19).

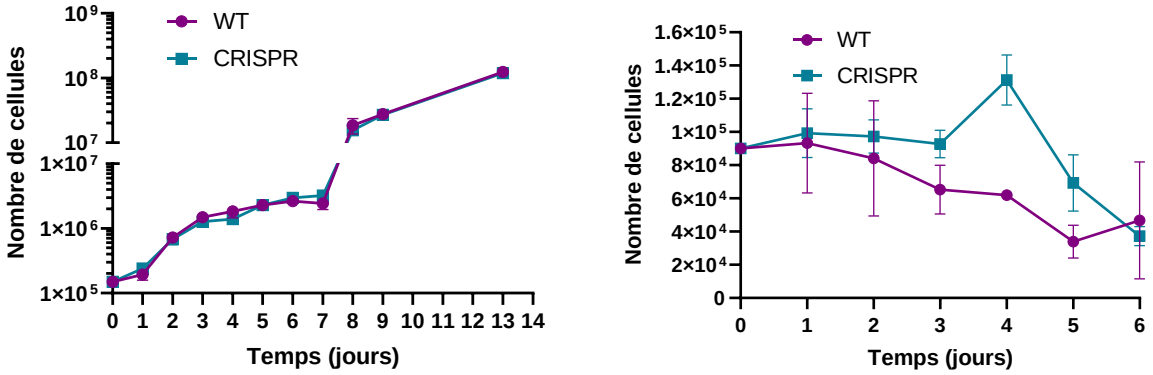


Figure 19 Courbes de prolifération de la lignée JVM-3 sauvage (WT) et éditée (CRISPR) cultivée dans du SVF 10% (gauche) et 1% (droite).
Chaque point représente la moyenne du nombre de cellules ± écart-type (n=3).

3.5. La perte d'expression de KDM6A entraine une modulation de l'expression des marqueurs CD123, CD23, CD79b et CD11c

Nous avons étudié l'expression de différents marqueurs de surface d'intérêt sur les cellules JVM-3 sauvages et éditées. Les anticorps utilisés font partie du panel lymphoïde B du laboratoire d'hématologie du CHU de Caen qui sert au diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs B. Aux marqueurs classiques des lymphocytes B, tels que le CD19 et le CD20, ont été ajoutés les marqueurs caractéristiques de la HCL constituant le score de Matutes: le CD103, le CD123, le CD25 et le CD11c (21,22) .

Une différence d'expression était estimée significative en cas de changement d'un facteur 2 minimum entre les médianes d'intensité de fluorescence. L'analyse a été réalisée à deux reprises. Nous avons observé une diminution significative de l'expression du CD79b, composant du BCR, et du CD23, récepteur de faible affinité aux IgE. Nous avons également observé une diminution de l'expression du CD11c, une intégrine, à la limite de la significativité. Enfin, nous avons constaté une augmentation significative de l'expression du CD123 sur la lignée éditée par rapport à la lignée sauvage (Figure 20). Le CD123 constitue la sous unité α du récepteur à l'interleukine 3 (IL-3), cytokine aux effets pléïotropiques.

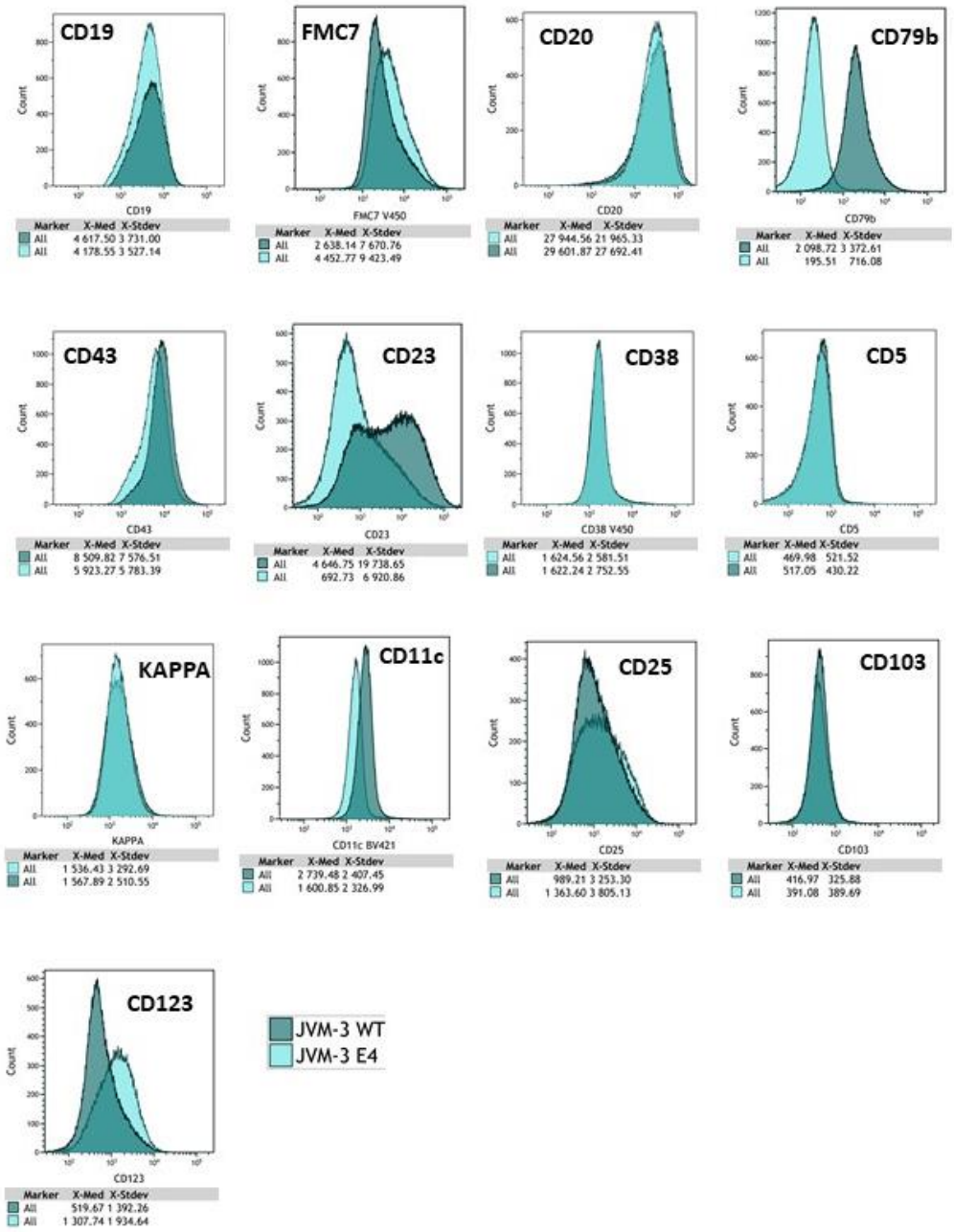


Figure 20 Comparaison de l'expression de différents marqueurs membranaires à la surface des cellules JVM-3 sauvages (WT) et éditées par le système CRISPR-Cas9 (E4)
Les cellules ont été incubés avec des anticorps couplés à un fluorochrome ciblant les marqueurs membranaires indiqués en abscisse. L'analyse des cellules a été réalisé sur le cytomètre en flux BD FACS CANTO II, 8 couleurs (Becton Dickinson). Les histogrammes représentent le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence de l'anticorps ont été réalisés sur le logiciel Kaluza (Beckman Coulter). Une différence significative d'expression entre les deux lignées est observée pour les marqueurs CD79b, CD23 et CD123.
Abréviations : X-Med : médiane d'intensité de fluorescence ; X-Stdev : écart-type ; CD : clusters de différenciation.

En complément de l'analyse des antigènes membranaires, nous avons testé les capacités d'adhérence des cellules JVM-3 sauvage et éditées à la fibronectine qui est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire permettant l'adhérence des cellules. Les tricholeucocytes interagissent avec la fibronectine par leurs intégrines CD49d et CD49e (55). Nous n'avons pas observé de différence significative d'adhérence des cellules à la fibronectine en fonction du statut mutationnel de *KDM6A* (Figure 21).

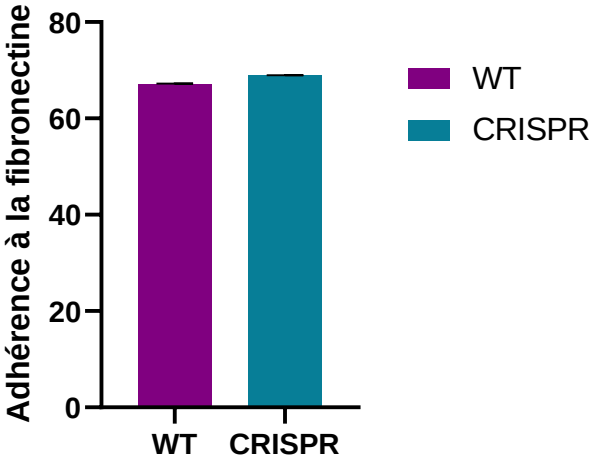


Figure 21 Capacités d'adhérence des cellules JVM-3 sauvages (WT) et éditées (CRISPR)
Une plaque recouverte de fibronectine a été ensemencée avec 5.10^5 cellules marquées par la calcéine AM, un composé fluorescent, par puits et incubée 2 h à 37°C. L'absorbance des différents puits a été mesurée à 490 nm avant lavage et après lavage des puits au PBS. Le lavage permet l'élimination des cellules non adhérentes. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de cellules présentes.

3.6. La perte d'expression de KDM6A ne module pas la sensibilité aux chimiothérapies et thérapies ciblées

La sensibilité des cellules de la lignée JVM-3 à la cladribine, un analogue de purine et au vémurafénib, un inhibiteur de BRAF a été testée. Ces molécules sont utilisées, respectivement, en première et en seconde intention, dans la leucémie à tricholeucocytes. La sensibilité à la doxorubicine, qui possède un mécanisme d'action différent des deux drogues citées précédemment, a également été testée. C'est une anthracycline qui agit comme intercalant de l'ADN et inhibiteur de topoisomérase II. Nous n'avons pas observé de différence de sensibilité en fonction du statut muté ou non de *KDM6A* (Figure 22).

La sensibilité des cellules à des thérapies ciblant l'environnement épigénétique de KDM6A a été évaluée. Les cellules ont été traitées avec un inhibiteur d'histone désacétylases, la romidepsine, un inhibiteur de protéines BET, l'ARV-825 et un inhibiteur d'EZH2, le tazemetostat. Les lignées sont sensibles à la romidepsine avec des CI_{50} similaires (7,7 nM *vs*. 8,0 nM) et résistantes à l'ARV-825 et au tazemetostat (Figure 22). L'efficacité de l'ARV-825 et du tazemetostat ont été vérifiées sur des lignées contrôle, les lignées Z-138 et RPMI-8226 respectivement. Des CI_{50} similaires à celles de la littérature ont été obtenues avec une CI_{50} de 2,05 µM pour la lignée RPMI-8226 (99) traitée par tazemetostat et une CI_{50} de 9 nM pour la lignée Z-138 traitée par ARV-825 (131).

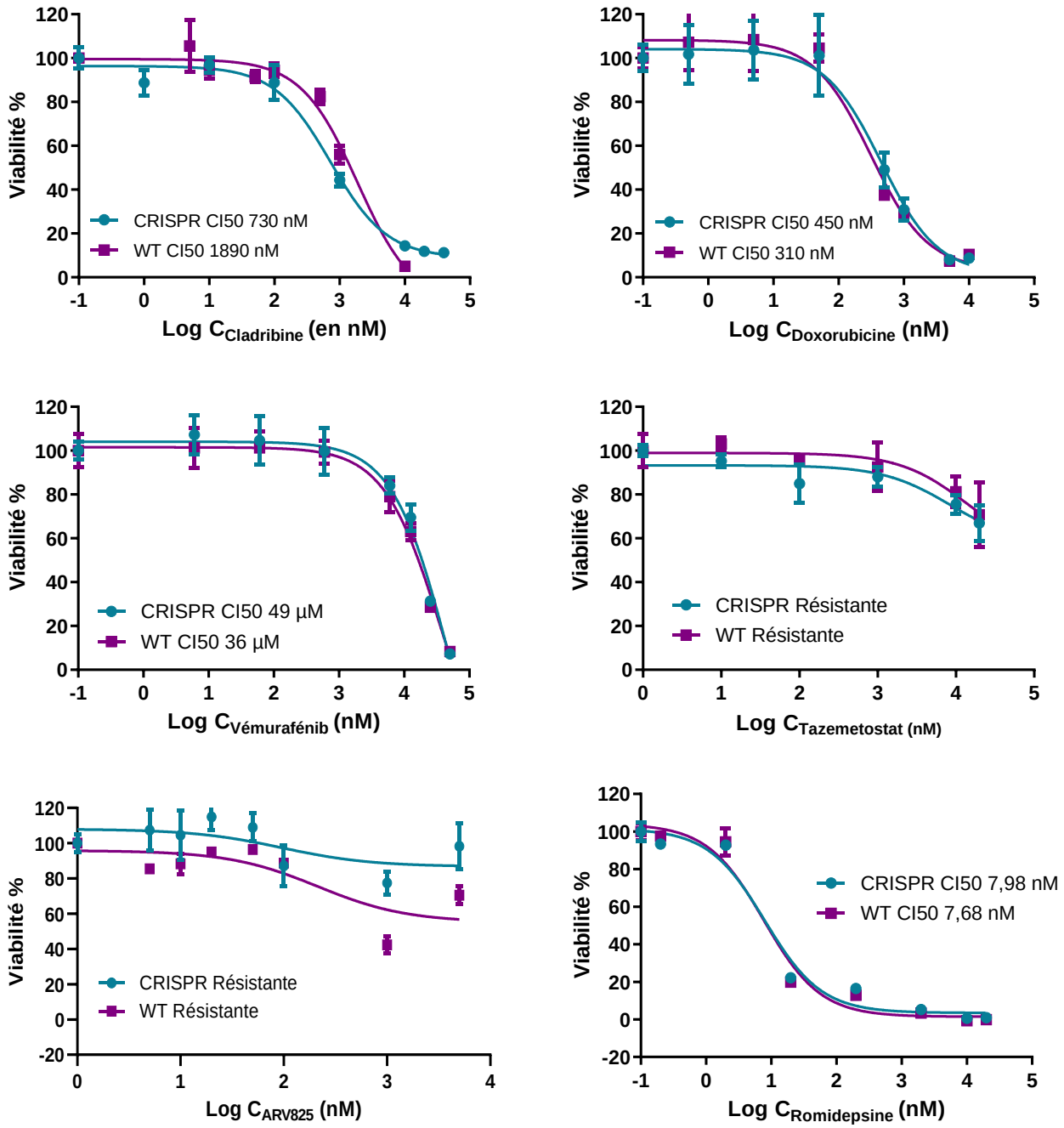


Figure 22 Sensibilité de la lignée JVM-3 sauvage (WT) et éditée (CRISPR) à différentes drogues
Les cellules ont été ensemencées à la densité de 10^5 cellules par puits puis incubées pendant 72 h en présence de concentrations croissantes des molécules à tester. Pour le tazemetostat, les cellules ont été incubées pendant 9 jours. Un contrôle avec 0,01 % de DMSO a été réalisé. L'analyse a été réalisée en triplicat. Un test MTS a permis de déterminer les CI50.

4. Discussion

Des mutations de *KDM6A* sont retrouvées dans un large spectre de cancers incluant des tumeurs solides et des hémopathies. Ces mutations entrainent, dans la grande majorité des cas, une perte d'expression de la protéine laissant suggérer un rôle suppresseur de tumeur. Les données cliniques montrent une association des mutations de *KDM6A* avec une survie raccourcie des patients (108,111). De plus, plusieurs études *in vitro* ont mis en évidence que la perte d'expression de *KDM6A* permettait l'acquisition d'un phénotype tumoral plus agressif (99,111,114). Cependant, tous les mécanismes physiopathologiques à l'origine de du développement de ces traits phénotypiques ne sont pas totalement élucidés. KDM6A possède une fonction spécifique de déméthylase vis-à-vis de H3K27me3 mais interagit également avec d'autres partenaires protéiques pour moduler la méthylation de H3K4 (KMT), l'acétylation de H3K27 (CBP/p300) et pour réguler la structure de la chromatine (SWI/SNF, SPT6) (94,97,101,104). L'implication prépondérante de la perte de l'une ou l'autre de ces activités dans l'oncogenèse semble différer en fonction du type tumoral.

Nous avons retrouvé des mutations clonales de *KDM6A* au diagnostic chez deux des quatre patients de sexe masculin atteints de HCL-v de notre cohorte publiée (37,64). De telles mutations ont également été retrouvées dans la forme classique de la maladie (28,34).

Si des travaux récents ont mis en évidence la présence d'une dérégulation des processus épigénétiques dans la leucémie à tricholeucocytes, les répercussions fonctionnelles n'ont pas encore été étudiées. Concernant plus spécifiquement la protéine KDM6A, les effets de sa perte d'expression dans le cadre des lymphoprolifération B sont peu connus. Cette étude avait ainsi pour objectif d'apporter un éclairage nouveau sur les modifications épigénétiques dans la HCL et de confirmer et d'enrichir les données préalables sur *KDM6A*, présenté dans la littérature comme un gène suppresseur de tumeur.

Les études fonctionnelles sur la HCL et la HCL-v sont délicates à mener du fait du manque de modèles cellulaires adéquats. Il ne peut être récupéré que peu ou pas de

cellules des patients car ils sont très souvent pancytopéniques et la moelle est difficilement prélevable car fibrosée. La réalisation de xénogreffes dérivées de la tumeur du patient (PDX) est pour l'instant en échec dans cette pathologie (125). Il n'existe pas non plus de modèles animaux. Dans ce contexte, plusieurs lignées cellulaires ont été développées et commercialisées. Cependant, plusieurs de ces lignées ont une origine douteuse et présentent des divergences avec la HCL, notamment l'absence fréquente de la mutation *BRAF*^{V600E} (35,132). Nous avions à notre disposition, au laboratoire, trois lignées cellulaires pouvant être utilisées comme modèle pour la HCL: JVM-3, JOK-1 et BONNA-12. Après caractérisation, la lignée JVM-3, qui possède une mutation activatrice alternative au variant V600E de *BRAF,* nous a paru être le modèle le plus fidèle de la HCL. La lignée BONNA-12 avait des caractéristiques plus proches de la forme variante de la maladie. La lignée JOK-1 ne possédait pas les attributs nécessaires pour être retenue. Aucune de ces lignées ne possédant de mutation de *KDM6A*, nous avons utilisé la technique du CRISPR-Cas9 pour réaliser une extinction stable de l'expression de *KDM6A*. La transfection du système par nucléofection a pu être réalisée dans la lignée JVM-3 mais pas dans la lignée BONNA-12. Pour cette dernière, il faudrait envisager une transfection par un vecteur viral ce qui nécessite d'avoir à disposition un laboratoire de type L3.

Afin d'avoir quelques résultats sur des cellules tumorales de patient, nous avons récupéré des cellules sanguines fraiches du patient UPN-v1 porteur d'une mutation de *KDM6A*. Cependant l'infiltration sanguine par les cellules tumorales au moment du prélèvement était trop faible pour la réalisation d'analyses sur cellules triées.

En parallèle, afin de pallier le manque de modèles cellulaires, nous avons envisagé l'introduction par le système CRISPR-Cas9 de la mutation *BRAF*^{V600E} dans une lignée de cellules B normales immortalisées par l'EBV, la lignée CM (127). Les premiers essais de transfection ont été réalisés avec des résultats encourageants. Cette lignée pourrait être utilisée par la suite pour la réalisation d'autres études fonctionnelles.

L'efficacité du système CRISPR-Cas9 dans la lignée JVM-3 a été confirmée par analyse génétique. La population cellulaire obtenue est une population hétérogène contenant une majorité de cellules présentant une délétion avec décalage du cadre de

lecture. Le site ciblé se situant dans l'un des premiers exon du gène, ces délétions sont susceptibles d'entrainer l'apparition d'un codon stop prématuré, la production d'un ARN messager tronqué ou d'une protéine tronquée non fonctionnelle. La perte d'expression de la protéine KDM6A résultant des anomalies génétiques introduites dans notre population cellulaire n'a pas pu être démontrée par western-blot pour l'instant. Deux anticorps différents ont été utilisés sans résultats probants. Des tests complémentaires doivent être réalisés.

En parallèle des analyses fonctionnelles effectuées sur la population JVM-3 hétérogène, un clonage cellulaire a été réalisé. Un clone a pu être isolé en milieu semi-solide. Les cellules présentent une délétion de 24 pb n'entrainant pas de décalage du cadre de lecture. Les conséquences sur l'expression et/ou l'activité de la protéine KDM6A sont donc incertaines et n'ont pas encore été caractérisées. L'exon 4 se situe dans une partie du gène codant pour un domaine tétratricopeptide. Ce type de domaine intervient dans les interactions protéine-protéine. Les domaines tétratricopeptides de KDM6A sont requis pour une activité déméthylase optimale sur H3K27me1 mais ne semblent pas indispensables à la déméthylation de H3K27me2/3 (133). Les conséquences fonctionnelles de certaines mutations intervenant dans ces domaines ont été étudiées. Les mutations G137V et D336G, par exemple, altèrent la capacité de KDM6A à interagir avec les complexes MLL et la localisation subcellulaire de KDM6A (134). Des effets similaires pourraient être observés dans notre lignée.

Afin d'étudier les conséquences fonctionnelles de la perte d'expression de KDM6A dans notre lignée cellulaire JVM-3, nous avons analysé différentes voies impliquées dans le processus oncogénique de la HCL, notamment la voie des MAP-kinases et la voie du BCR, ainsi que les capacités prolifératives et d'adhérence des cellules.

La voie des MAP-kinases est activée de manière constitutive dans la HCL et la HCL-v par la présence de mutations activatrices de *BRAF* (26) ou de *MAP2K1* (28). Son activation induit des signaux de prolifération, de survie et d'invasion cellulaires. Certaines données cliniques suggéraient une possible coopération des anomalies génétiques affectant la voie des MAP-kinases et *KDM6A*. Ainsi, le patient de notre cohorte ayant une coexistence des mutations de *MAP2K1* et de *KDM6A* dans ses

cellules tumorales présentait une maladie particulièrement agressive et résistante à de nombreuses thérapeutiques (64). D'autre part, dans la forme classique de la maladie, il a été rapporté l'apparition d'une mutation de *KDM6A* à la rechute suite à un traitement de première ligne par inhibiteur de BRAF (34). En concordance avec ces données, nous avons observé une nette augmentation de la phosphorylation de ERK après édition du gène *KDM6A* dans la lignée JVM-3. Cependant, malgré l'augmentation de pERK observée, les cellules JVM-3 éditées n'ont pas montré de capacités proliférative supérieures aux cellules sauvages, ni de modification de leur sensibilité à un inhibiteur de BRAF, le vémurafénib. Des résultats similaires ont été rapportés dans des modèles de leucémies aigues lymphoblastiques B dans lesquels l'expression de *CREBBP,* qui code pour une protéine de l'épigénétique dont l'action est conjointe à celle de KDM6A, avait été diminuée par technique ARN interférent. La perte d'expression de *CREBBP* favorisait la voie des MAPK en présence, spécifiquement, de mutations des gènes *RAS* sans affecter la prolifération et la survie des cellules, ni leur sensibilité à un inhibiteur de MEK, le U0126 (79). Dans notre étude, il a été observé une activation accrue de la voie des MAP-kinases par augmentation de la phosphorylation de son effecteur terminal, mais le processus cellulaire y aboutissant n'a pas été détaillé. La perte d'expression de KDM6A dans notre lignée n'a pas modifié le taux global de H3K27me3. Ce taux est inconstamment affecté en fonction du modèle de cancer (109,135) et, dans certains cas, seules des modifications loci-spécifiques sont visibles (99). En dehors de l'impact du défaut de KDM6A sur la méthylation de H3K27, il a été montré un effet également sur la méthylation de H3K4 et l'acétylation de H3K27 (97–100). Pour détailler le mécanisme aboutissant à l'augmentation de pERK, il serait intéressant d'analyser l'expression des différentes protéines de la voie des MAPK (RAS , RAF, MEK) et d'en réaliser le profil épigénétique (méthylation de H3K27 et H3K4 et acétylation de H3K27) par une technique d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage (ChIP-seq).

En accord avec l'augmentation observée de l'activation de la voie des MAPK, nous avons également mis en évidence l'intensification de l'expression de la survivine, une protéine impliquée dans la régulation du cycle et de la mort cellulaires. Dans les cellules tumorales en général, la survivine est exprimée de manière aberrante

indépendamment du cycle cellulaire et l'intensité de son expression est un facteur pronostique. Sa surexpression dans le cancer s'explique par la dérégulation des nombreuses voies qui contrôlent sa transcription (PI3K, NF-κB, p53...) (130). L'augmentation de son expression observée dans les cellules JVM-3 éditées pourrait expliquer leur meilleure survie en milieu de culture restrictif en nutriments (SVF 1 %).

De manière similaire dans le myélome multiple, l'analyse transcriptomique montrait une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire dans les cellules ayant perdu l'expression de *KDM6A*. Cette modification au niveau de l'expression génique s'accompagnait d'une augmentation de la prolifération, de la clonogénicité et de la tumorogénicité des cellules tumorales (99).

Concernant la voie du BCR, nous n'avons pas observé de modification des 3 protéines analysées intervenant à différents niveaux de la voie : la kinase BTK située en amont, la kinase AKT activée *via* l'action du PI3K et IKB-α, un inhibiteur de la voie canonique de NF-κB. En revanche, nous avons constaté une diminution de l'expression du CD79b en cytométrie en flux. Le CD79b est un composant du BCR permettant la transduction du signal. Il est essentiel à l'exportation de l'IgM à la surface des lymphocytes B. Une faible expression du CD79b est observée classiquement dans la leucémie lymphoïde chronique. La voie du BCR étant impliquée dans le processus oncogénique de la LLC et de la HCL, une diminution de l'expression du CD79b pourrait paraître paradoxale. Plusieurs mécanismes d'activation du BCR sont décrits dans la LLC, antigène-dépendants et antigène-indépendants (136) et cette activation semble lier au microenvironnement. Ainsi, il est décrit une prolifération préférentielle des cellules de LLC au sein des ganglions par rapport à la circulation sanguine en lien avec une activation du BCR. L'interleukine 4 produit par le microenvironnement ganglionnaire rétablit l'expression de l'IgM de surface permettant une réponse correcte à la signalisation du BCR (137). Dans notre modèle cellulaire et dans les conditions de culture utilisées, c'est-à-dire en dehors de tout microenvironnement, l'activation de la voie du BCR semble constitutive et indépendante de la transduction du signal par le CD79b.

Dans le myélome multiple, la perte d'expression de *KDM6A* est responsable d'une augmentation des capacités d'adhérence des cellules à la fibronectine concordant avec la mise en évidence, par analyse transcriptomique, d'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'adhérence (99). Nous n'avons pas observé le même effet sur la lignée JVM-3, les cellules sauvages et éditées présentant les mêmes capacités d'adhérence à la fibronectine. Parmi les antigènes membranaires du panel lymphoïde B utilisé en cytométrie en flux, aucun n'intervient directement dans la liaison à la fibronectine. Il aurait pu être intéressant de regarder, en complément de ce panel, l'expression du CD49d, du CD49e, du CD44 et du CD51 qui sont les molécules d'adhérence impliquées dans la liaison du tricholeucocyte avec les éléments de la matrice extracellulaire dont la fibronectine (55). Les anticorps ciblant ces marqueurs ne sont pas utilisés en routine au laboratoire ce qui rend leur accès plus difficile. De manière intéressante, parmi les antigènes étudiés, nous avons constaté une modulation de l'expression du CD11c, du CD23 et du CD123. Cela pourrait avoir un impact sur les interactions du tricholeucocyte avec les éléments du microenvironnement autres que la fibronectine :

- Le CD11c est une intégrine préférentiellement exprimée par les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et, de manière plus anecdotique, par certains lymphocytes B et T activés et polynucléaires. Il permet la liaison à l'iC3b, un fragment protéique du système du complément, au fibrinogène et à la molécule d'adhésion ICAM-1 présente à la surface des cellules endothéliales et des lymphocytes. Du fait de ses ligands, le CD11c est impliqué dans les phénomènes de phagocytose, de migration cellulaire, de production de cytokines par les monocytes/macrophages, de stimulation immune et de coagulation (138). En oncohématologie, l'expression atypique du CD11c est retrouvée dans la HCL et, de manière moins constante, dans certaines leucémies aigues myéloïdes et hémopathies lymphoïdes B telles que la LLC ou le lymphome du manteau. Bien que l'expression du CD11c soit bien décrite dans ces pathologies et ait un intérêt diagnostique dans la HCL, son rôle dans la physiopathologie reste vague. Les LLC CD11c positives seraient associées

à un nombre plus important de manifestations auto-immunes et de cancers secondaires (139).

- Le CD23 est un récepteur de faible affinité aux IgE (FcεRII). Il interagit également avec le CD21, qui est un récepteur du complément participant à l'activation des cellules B, et avec diverses intégrines présentes sur les monocytes (αMβ2 et αXβ2). Sa forme soluble, sCD23, soutient la croissance des lymphocytes B activés, la différentiation plasmocytaire et permet aux précurseurs B d'échapper à l'apoptose. Le CD23 est exprimé de manière transitoire par les lymphocytes B matures activés avant la phase de commutation isotypique (140). Il existe deux isoformes du CD23, le CD23a et le CD23b. L'expression du CD23a est constitutive alors que la transcription du CD23b est conditionnée par divers stimuli : infection par l'EBV, stimulation par l'interleukine 4 ou engagement du CD40. Dans la LLC, dont le CD23 est un marqueur diagnostic, l'expression des deux isoformes, CD23a et CD23b, est associée à la survie et à la prolifération des cellules tumorales, respectivement. Il semblerait, cependant, que le taux d'expression du CD23 et sCD23 est peu d'intérêt pronostique (141). Le CD23 n'étant classiquement pas observé sur les tricholeucocytes, son implication dans la physiopathologie de la maladie est peu connue (19). Son expression sur la lignée JVM-3 pourrait s'expliquer par son immortalisation à l'aide de l'EBV. L'infection par ce virus induit en effet l'expression du CD23 *via*, entre autres, l'antigène EBNA-2 (antigène nucléaire de l'EBV) exprimé dans les infections latentes (142).
- Le CD123, quant à lui, constitue la sous unité α du récepteur à l'interleukine 3 (IL-3). L'IL-3 est une cytokine aux effets pléïotropiques qui est principalement produite par les lymphocytes T et qui régule la fonction et la production des cellules du système hématopoïétique et favorise la prolifération des cellules endothéliales (143). L'expression du CD123 est retrouvée sur les précurseurs érythroïdes, mégacaryocytaires et granuleux. Au stade mature, l'expression est maintenue sur les polynucléaires et, en partie, sur les monocytes. En pathologie hématologique, le CD123 est exprimé dans les leucémies à cellules plasmocytoïdes dendritiques, dans certaines leucémies aigues

lymphoblastiques B et leucémies aigues myéloïdes et, de manière quasi-constante, dans la HCL (21). Dans les LAM, son expression est associée à un mauvais pronostic avec une prolifération plus importante des cellules et une résistance à l'apoptose. Des thérapies ciblant le CD123 sont en cours de développement (143). Dans la HCL, le rôle fonctionnel du CD123 est peu documenté et son expression sert surtout de marqueur diagnostique. Dans notre lignée JVM-3, son expression est augmentée.

L'interprétation de ces modifications d'expression est difficile puisque l'implication de certains de ces antigènes dans le processus oncogénique de la HCL n'est pas toujours totalement élucidée. D'autre part, l'ensemble de ces antigènes membranaires, incluant le CD79b, interviennent soit dans la réponse à des stimuli extérieurs cytokiniques ou antigéniques, soit dans les interactions avec d'autres types cellulaires : monocytes, lymphocytes, cellules endothéliales, etc. Les effets fonctionnels potentiels sur l'échappement au système immunitaire, le *homing*, la migration ou encore la survie des cellules sont ainsi difficiles à mettre en évidence dans un milieu de culture liquide où les cellules tumorales sont isolées.

La seconde partie de notre étude avait pour objectif d'évaluer l'impact de la perte d'expression de *KDM6A* sur la réponse de la HCL aux traitements utilisés actuellement chez les patients et de tester de nouvelles thérapies ciblées.

La HCL se traite en première ligne par des analogues de purine (58). Ceux-ci permettent l'obtention d'une rémission complète dans la majorité des cas. Cependant, un quart des patients vont rechuter à plus ou moins long terme (56). En seconde ligne peuvent être réutilisés les analogues de purine plus ou moins associés à du rituximab mais également des inhibiteurs de BRAF, un anti-CD22, le moxetumomab-pasudotox, ou l'ibrutinib. La HCL-v est une pathologie à l'arsenal thérapeutique plus restreint puisque répondant mal aux analogues de purine. Les thérapies alternatives utilisées en seconde ligne dans la HCL se révèlent également souvent moins efficaces dans la HCL-v. La présence d'une mutation délétère de *KDM6A* ne semble pas favoriser la réponse aux traitements. Un des deux patients de notre cohorte HCL-v porteur d'une mutation de *KDM6A* en est actuellement à sa 5ème ligne thérapeutique. Dans la HCL,

un des cas rapporté montre l'apparition d'une mutation de *KDM6A* après traitement par inhibiteur de BRAF (34).

La compréhension du mécanisme oncogénique de la perte d'expression de *KDM6A* est essentielle à l'identification de cibles thérapeutiques. Le rééquilibrage des niveaux de méthylation physiologiques par l'utilisation d'inhibiteurs d'EZH2, l'antagoniste de KDM6A, est une stratégie thérapeutique évidente et prometteuse puisque le tazemetostat est actuellement engagé dans plusieurs essais cliniques de phase I et II. Plusieurs études dans le cancer de la vessie (115), les LAL-T (114) et le myélome multiple (99,116) ont montré que la perte d'expression de *KDM6A* sensibilisait les cellules tumorales aux inhibiteurs d'EZH2. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence cet effet sur la lignée JVM-3 qui reste, dans tous les cas, résistante au tazemetostat. L'efficacité de la molécule et du protocole utilisés a été vérifiée sur une lignée contrôle de myélome multiple, RPMI-8226, et une CI_{50} similaire à celle la littérature a été obtenue (99). En réalité, l'augmentation de la sensibilité aux inhibiteurs d'EZH2 en cas d'absence de KDM6A n'est pas toujours démontrée et dépend de plusieurs paramètres. Ainsi, les lignées de myélome multiple KMS34-SCC1 (*KDM6A* sauvage) et KMS34-SCC2 (*KDM6A* muté) ont montré une sensibilité similaire aux inhibiteurs d'EZH2 malgré un statut mutationnel de *KDM6A* différent. Une autre étude dans le MM ne retrouvait pas d'association entre l'expression de *KDM6A* et la réponse aux inhibiteurs d'EZH2 (144). D'autres altérations génétiques pourraient ainsi jouer un rôle dans la réponse à ce type de traitement.

Dans le cancer du pancréas, les lignées cellulaires *KDM6A* muté n'ont pas montré de sensibilité accrue aux inhibiteurs d'EZH2 (100,111). Dans ce type de cancer, le rôle oncogénique de KDM6A ne dépendrait pas de son activité catalytique de déméthylase. Ainsi, l'expression ectopique d'une protéine KDM6A ayant perdu son activité déméthylase a permis de restaurer la croissance des cellules tumorales (111). Les inhibiteurs d'EZH2 n'agissant pas directement sur la modulation des autres marques épigénétiques ciblées indirectement par KDM6A *via* ses interactions avec d'autres protéines (86), ceci pourrait expliquer l'absence de réponse des cellules tumorales.

D'autre part, le protocole d'étude de la sensibilité aux modulateurs épigénétiques est plus difficile à concevoir que pour les chimiothérapies classiques. Dans les études sur le MM, le traitement a été réalisé sur 7 jours (99,145). A 3 jours, les effets du traitement n'étaient pas visibles (144). Dans les études sur le cancer du pancréas, les cellules n'ont été exposées que 72 h ce qui pourrait également expliquer leurs résultats négatifs. De plus, dans certaines lignées de MM, malgré des effets démontrés importants de l'EPZ-6438 sur la régulation génique, aucun effet sur la prolifération n'a pu être mis en évidence (144). Certaines études suggèrent d'adopter un milieu de culture mimant le microenvironnement pour mieux mettre en évidence les effets des thérapies ciblant l'épigénétique. Dans le cancer de l'ovaire, par exemple, les effets des inhibiteurs d'EZH2 n'ont pu être mis en évidence que dans un milieu de culture en trois dimensions de type matrigel contenant les éléments de la matrice extracellulaire (146). Aucun effet en milieu de culture classique n'a été observé. Dans notre étude, les cellules ont été exposées pendant 9 jours à l'EPZ-6438 ce qui parait suffisant par rapport aux données de la littérature. Il pourrait être intéressant de réaliser des tests de sensibilité dans un milieu de culture plus complexe intégrant des éléments de la matrice extra-cellulaire.

Dans le cancer du pancréas, d'autres pistes thérapeutiques ont été envisagées : les inhibiteurs d'histone désacétylases et les inhibiteurs de protéines BET (100,111). L'efficacité des inhibiteurs de BET dans le cancer du pancréas s'expliquerait par l'inhibition de l'expression de *MYC* (121) qui est favorisée par l'absence d'expression de *KDM6A*. Les HDACi permettent de rétablir un équilibre dans l'acétylation de H3K27 qui est diminuée par la perte d'expression de *KDM6A*. En effet, KDM6A favorise l'activité du complexe CBP/p300 qui acétyle H3K27 (97). Nous avons testé un inhibiteur de BET, l'ARV-825 et un inhibiteur d'histone désacétylase, la romidepsine. Nous n'avons pas montré de différence de sensibilité entre la lignée JVM-3 sauvage et éditée.

Concernant ce dernier, l'implication prépondérante des différentes cibles épigéniques de KDM6A, H3K27me3, H3K27ac et H3K4me, dans l'oncogenèse de la HCL doit être précisée afin de tester les thérapies ciblées les plus appropriées.

Un point qui n'a pas été étudié est le statut mutationnel de *UTY*, le paralogue de *KDM6A* sur le chromosome Y dans la lignée JVM-3 mais également chez les patients, UPN-v1 et UPN-v2. UTY n'est pas capable de compenser l'activité déméthylase de KDM6A mais pourrait la remplacer dans ses interactions avec les complexes MLL et CBP/p300 influant ainsi potentiellement sur la méthylation de H3K4 et l'acétylation de H3K27. Il serait intéressant de séquencer UTY dans notre lignée et chez les patients.

5. Conclusion

L'avènement des techniques de séquençage à haut débit a permis de mieux définir le paysage mutationnel de la HCL et de la HCL-v et de mettre en évidence la présence de variants délétères au sein des gènes de l'épigénétique dont *KDM6A*.

La mise au point de la technique de transfection par nucléofection du système CRISPR-Cas9 au sein de la lignée JVM-3 nous a permis d'éditer le gène *KDM6A*. Cette technique pourra être utilisée par la suite pour l'étude d'autres anomalies génétiques récurrentes dans la HCL.

L'inactivation de KDM6A paraît concourir à l'activation de la voie oncogénique des MAPK dans la HCL mais modifie peu les capacités prolifératives et d'adhésion des tricholeucocytes et leur réponse aux chimiothérapies et thérapies ciblées.

La réalisation d'analyses sur un clone cellulaire possédant une mutation délétère de *KDM6A* et sur un second modèle cellulaire comme la lignée CM conforterait nos résultats. D'autre part, l'utilisation d'un modèle de culture plus proche du microenvironnement naturel des tricholeucocytes, qui ont la capacité particulière de se loger dans la niche hématopoïétique et d'induire une fibrose médullaire, pourrait permettre de faire ressortir davantage le rôle potentiel de suppresseur de tumeur de KDM6A dans la HCL.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic Reticuloendotheliosis. Blood. juill 1958;13(7):609-30.

2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 19 mai 2016;127(20):2375-90.

3. Monnereau A, Slager SL, Hughes AM, Smith A, Glimelius B, Habermann TM, et al. Medical History, Lifestyle, and Occupational Risk Factors for Hairy Cell Leukemia: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. J Natl Cancer Inst Monogr. 1 août 2014;2014(48):115-24.

4. Dunford A, Weinstock DM, Savova V, Schumacher SE, Cleary JP, Yoda A, et al. Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. Nature Genetics. janv 2017;49(1):10-6.

5. Cornet E, Tomowiak C, Tanguy-Schmidt A, Lepretre S, Dupuis J, Feugier P, et al. Long-term follow-up and second malignancies in 487 patients with hairy cell leukaemia. British Journal of Haematology. août 2014;166(3):390-400.

6. Zheng G, Chattopadhyay S, Sud A, Sundquist K, Sundquist J, Försti A, et al. Second primary cancers in patients with acute lymphoblastic, chronic lymphocytic and hairy cell leukaemia. British Journal of Haematology. avr 2019;185(2):232-9.

7. Paltiel O, Adler B, Barchana M, Dann EJ. A population-based study of hairy cell leukemia in Israel. European Journal of Haematology. 2006;77(5):372-7.

8. da Silva WF, Neto AC, da Rosa LI, de Siqueira IA, Amarante GD, Velloso EDRP, et al. Outcomes and second neoplasms in hairy cell leukemia: A retrospective cohort. Leukemia Research. août 2019;83:106165.

9. Watts JM, Kishtagari A, Hsu M, Lacouture ME, Postow MA, Park JH, et al. Melanoma and non-melanoma skin cancers in hairy cell leukaemia: a Surveillance, Epidemiology and End Results population analysis and the 30-year experience at Memorial Sloan Kettering Cancer Center. Br J Haematol. oct 2015;171(1):84-90.

10. Bourguin-Plonquet A, Rouard H, Roudot-Thoraval F, Bellanger C, Marquet J, Delfau-Larue M-H, et al. Severe decrease in peripheral blood dendritic cells in hairy cell leukaemia. Br J Haematol. mars 2002;116(3):595-7.

11. Netea MG, Hoitink O, Kullberg BJ, van der Meer JWM, Raymakers R. Defective interferon-gamma production in patients with hairy cell leukaemia. Neth J Med. sept 2008;66(8):340-334.

12. van de Corput L, Falkenburg JH, Kester MG, Willemze R, Kluin-Nelemans JC. Impaired expression of CD28 on T cells in hairy cell leukemia. Clin Immunol. déc 1999;93(3):256-62.

13. Cawley JC, Burns GF, Hayhoe FGJ. A chronic lymphoproliferative disorder with distinctive features: a distinct variant of hairy-cell leukaemia. Leukemia Research. 1 janv 1980;4(6):547-59.

14. Matutes E, Martínez-Trillos A, Campo E. Hairy cell leukaemia-variant: Disease features and treatment. Best Pract Res Clin Haematol. déc 2015;28(4):253-63.

15. Bennett C, Vardiman J, Golomb H. Disseminated atypical mycobacterial infection in patients with hairy cell leukemia. Am J Med. mai 1986;80(5):891-6.

16. Rose C, Auxenfants E, Noel MP, Mahieu M, Demory JL, Croxo C, et al. Tuberculosis, mycobacterium infection and hairy cell leukemia. Presse Med. 8 févr 1997;26(3):110-4.

17. Seshadri RS, Brown EJ, Zipursky A. Leukemic reticuloendotheliosis. A failure of monocyte production. N Engl J Med. 22 juill 1976;295(4):181-4.

18. Jasionowski TM, Hartung L, Greenwood JH, Perkins SL, Bahler DW. Analysis of CD10+ hairy cell leukemia. Am J Clin Pathol. août 2003;120(2):228-35.

19. Chen Y-H, Tallman MS, Goolsby C, Peterson L. Immunophenotypic variations in hairy cell leukemia. Am J Clin Pathol. févr 2006;125(2):251-9.

20. Poret N, Fu Q, Guihard S, Cheok M, Miller K, Zeng G, et al. CD38 in Hairy Cell Leukemia Is a Marker of Poor Prognosis and a New Target for Therapy. Cancer Research. 15 sept 2015;75(18):3902-11.

21. Matutes E. Immunophenotyping and Differential Diagnosis of Hairy Cell Leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. oct 2006;20(5):1051-63.

22. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houliham A, 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 Suppl 1:57-61.

23. Favre R, Manzoni D, Traverse-Glehen A, Verney A, Jallades L, Callet-Bauchu E, et al. Usefulness of CD200 in the differential diagnosis of SDRPL, SMZL, and HCL. International Journal of Laboratory Hematology. 2018;40(4):e59-62.

24. Wotherspoon A, Attygalle A, Sena Teixeira Mendes L. Bone marrow and splenic histology in hairy cell leukaemia. Best Practice & Research Clinical Haematology. 1 déc 2015;28(4):200-7.

25. Troussard X, Cornet E. Proliférations lymphoïdes B matures à cellules chevelues. Ann Biol Clin. 2015;73(4):399-406.

26. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF Mutations in Hairy-Cell Leukemia. N Engl J Med. 16 juin 2011;364(24):2305-15.

27. 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. mai 2014;165(4):529-33.

28. Waterfall JJ, Arons E, Walker RL, Pineda M, Roth L, Killian JK, et al. High prevalence of MAP2K1 mutations in variant and IGHV4-34–expressing hairy-cell leukemias. Nat Genet. 17 nov 2013;46(1):8-10.

29. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. Expert Opinion on Therapeutic Targets. avr 2012;16(sup2):S17-27.

30. Arons E, Suntum T, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. VH4-34+ hairy cell leukemia, a new variant with poor prognosis despite standard therapy. Blood. 19 nov 2009;114(21):4687-95.

31. Xi L, Arons E, Navarro W, Calvo KR, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, et al. Both variant and IGHV4-34–expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. Blood. 5 avr 2012;119(14):3330-2.

32. Pettirossi V, Santi A, Imperi E, Russo G, Pucciarini A, Bigerna B, et al. BRAF inhibitors reverse the unique molecular signature and phenotype of hairy cell leukemia and exert potent antileukemic activity. Blood. 2015;125(8):1207–1216.

33. Chung SS, Kim E, Park JH, Chung YR, Lito P, Teruya-Feldstein J, et al. Hematopoietic stem cell origin of BRAFV600E mutations in hairy cell leukemia. Sci Transl Med. 28 mai 2014;6(238):238ra71.

34. Dietrich S, Hüllein J, Lee SC-W, Hutter B, Gonzalez D, Jayne S, et al. Recurrent CDKN1B (p27) mutations in hairy cell leukemia. Blood. 2015;126(8):1005–1008.

35. Weston-Bell NJ, Tapper W, Gibson J, Bryant D, Moreno Y, John M, et al. 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, éditeur. PLOS ONE. 12 févr 2016;11(2):e0149162.

36. Durham BH, Getta B, Dietrich S, Taylor J, Won H, Bogenberger JM, et al. Genomic analysis of hairy cell leukemia identifies novel recurrent genetic alterations. Blood. 11 août 2017;130(14):1644-8.

37. Maitre E, Bertrand P, Maingonnat C, Viailly P-J, Wiber M, Naguib D, et al. New generation sequencing of targeted genes in the classical and the variant form of hairy cell leukemia highlights mutations in epigenetic regulation genes. Oncotarget. 22 juin 2018;9(48):28866-76.

38. Wiber M, Maitre E, Troussard X. Next generation sequencing in patients with hairy cell leukemia (HCL). Hématologie. 1 juill 2019;25(4):178-90.

39. Basso K, Liso A, Tiacci E, Benedetti R, Pulsoni A, Foa R, et al. 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. 5 janv 2004;199(1):59-68.

40. Arons E, Sunshine J, Suntum T, Kreitman RJ. Somatic hypermutation and VH gene usage in hairy cell leukaemia. Br J Haematol. juin 2006;133(5):504-12.

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. juill 2014;166(2):177-88.

42. Nagel S, Ehrentraut S, Meyer C, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RAF. NFkB is activated by multiple mechanisms in hairy cell leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 2015;54(7):418-32.

43. Nayak L, Goduni L, Takami Y, Sharma N, Kapil P, Jain MK, et al. Kruppel-Like Factor 2 Is a Transcriptional Regulator of Chronic and Acute Inflammation. Am J Pathol. mai 2013;182(5):1696-704.

44. Hart GT, Wang X, Hogquist KA, Jameson SC. Krüppel-like factor 2 (KLF2) regulates B-cell reactivity, subset differentiation, and trafficking molecule expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 11 janv 2011;108(2):716-21.

45. Piva R, Deaglio S, Famà R, Buonincontri R, Scarfò I, Bruscaggin A, et al. The Krüppel-like factor 2 transcription factor gene is recurrently mutated in splenic marginal zone lymphoma. Leukemia. févr 2015;29(2):503-7.

46. Arribas AJ, Rinaldi A, Chiodin G, Kwee I, Mensah AA, Cascione L, et al. Genome-wide promoter methylation of hairy cell leukemia. Blood advances. 2019;3(3):384–396.

47. Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. Nat Rev Cancer. avr 2008;8(4):253-67.

48. Miranda RN, Briggs RC, Kinney MC, Veno PA, Hammer RD, Cousar JB. Immunohistochemical detection of cyclin D1 using optimized conditions is highly

specific for mantle cell lymphoma and hairy cell leukemia. Mod Pathol. 2000;13(12):1308.

49. Curiel-Olmo S, Mondéjar R, Almaraz C, Mollejo M, Cereceda L, Marès R, et al. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma displays increased expression of cyclin D3 and recurrent CCND3 mutations. Blood. 23 févr 2017;129(8):1042-5.

50. Grever MR, Abdel-Wahab O, Andritsos LA, Banerji V, Barrientos J, Blachly JS, et al. Consensus guidelines for the diagnosis and management of patients with classic hairy cell leukemia. Blood. 2 févr 2017;129(5):553-60.

51. Je EM, Yoo NJ, Kim YJ, Kim MS, Lee SH. Mutational analysis of splicing machinery genes SF3B1, U2AF1 and SRSF2 in myelodysplasia and other common tumors. Int J Cancer. 2013;133(1):260-5.

52. Shirai CL, White BS, Tripathi M, Tapia R, Ley JN, Ndonwi M, et al. Mutant U2AF1-expressing cells are sensitive to pharmacological modulation of the spliceosome. Nature Communications. 9 janv 2017;8(1):14060.

53. Burthem J, Cawley JC. The bone marrow fibrosis of hairy-cell leukemia is caused by the synthesis and assembly of a fibronectin matrix by the hairy cells. Blood. 1994;83(2):497–504.

54. Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Hubmann R, Duechler M, Gisslinger H. TGF-β1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. J Clin Invest. 1 mars 2004;113(5):676-85.

55. Sivina M, Burger JA. The importance of the tissue microenvironment in hairy cell leukemia. Best Pract Res Clin Haematol. déc 2015;28(4):208-16.

56. Else M, Dearden CE, Catovsky D. Long-term follow-up after purine analogue therapy in hairy cell leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol. déc 2015;28(4):217-29.

57. Goodman GR, Burian C, Koziol JA, Saven A. Extended follow-up of patients with hairy cell leukemia after treatment with cladribine. J Clin Oncol. 1 mars 2003;21(5):891-6.

58. Troussard X, Cornet E. Hairy cell leukemia 2018: Update on diagnosis, risk-stratification, and treatment. Am J Hematol. déc 2017;92(12):1382-90.

59. Tiacci E, Park JH, De Carolis L, Chung SS, Broccoli A, Scott S, et al. Targeting Mutant BRAF in Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia. New England Journal of Medicine. 29 oct 2015;373(18):1733-47.

60. Luebker SA, Koepsell SA. Diverse Mechanisms of BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma Identified in Clinical and Preclinical Studies. Front Oncol. 17 avr 2019;9(268).

61. Kreitman RJ, Moreau P, Hutchings M, Gazzah A, Blay J-Y, Wainberg ZA, et al. Treatment with Combination of Dabrafenib and Trametinib in Patients with Recurrent/Refractory BRAF V600E-Mutated Hairy Cell Leukemia (HCL). Blood. 21 nov 2018;132(Suppl 1):391-391.

62. Kreitman RJ, Dearden C, Zinzani PL, Delgado J, Karlin L, Robak T, et al. Moxetumomab pasudotox in relapsed/refractory hairy cell leukemia. Leukemia. août 2018;32(8):1768-77.

63. Getta BM, Park JH, Tallman MS. Hairy cell leukemia: Past, present and future. Best Practice & Research Clinical Haematology. 1 déc 2015;28(4):269-72.

64. Wiber M, Maitre E, Cornet E, Salaün V, Naguib D, Troussard X. Variant form of hairy cell leukemia. Clinical Case Reports. 6 mai 2019;7:1161– 1166.

65. Bohn J-P, Wanner D, Steurer M. Ibrutinib for relapsed refractory hairy cell leukemia variant. Leuk Lymphoma. 4 mai 2017;58(5):1224-6.

66. Hockley SL, Else M, Morilla A, Wotherspoon A, Dearden C, Catovsky D, et al. The prognostic impact of clinical and molecular features in hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma. Br J Haematol. août 2012;158(3):347-54.

67. Angelova EA, Medeiros LJ, Wang W, Muzzafar T, Lu X, Khoury JD, et al. Clinicopathologic and molecular features in hairy cell leukemia-variant: single institutional experience. Mod Pathol. nov 2018;31(11):1717-32.

68. Bertoni F, Rossi D, Zucca E. Recent advances in understanding the biology of marginal zone lymphoma. F1000Res. 28 mars 2018;7.

69. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC-, Morel D, Gazzo S, Ffrench M, et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? Blood. 15 févr 2008;111(4):2253-60.

70. Jallades L, Baseggio L, Sujobert P, Huet S, Chabane K, Callet-Bauchu E, et al. Exome sequencing identifies recurrent BCOR alterations and the absence of KLF2, TNFAIP3 and MYD88 mutations in splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma. Haematologica. oct 2017;102(10):1758-66.

71. Perrone S, D'Elia GM, Annechini G, Ferretti A, Tosti ME, Foà R, et al. Splenic marginal zone lymphoma: Prognostic factors, role of watch and wait policy, and other therapeutic approaches in the rituximab era. Leuk Res. mai 2016;44:53-60.

72. Valencia AM, Kadoch C. Chromatin regulatory mechanisms and therapeutic opportunities in cancer. Nature Cell Biology. févr 2019;21(2):152-61.

73. Zhang T, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications - writers that read. EMBO reports. 1 nov 2015;16(11):1467-81.

74. Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 1 juill 2008;659(1):40-8.

75. Lue JK, Amengual JE, O'Connor OA. Epigenetics and Lymphoma: Can We Use Epigenetics to Prime or Reset Chemoresistant Lymphoma Programs? Current Oncology Reports. sept 2015;17(9).

76. Kelly AD, Issa J-PJ. The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome. Curr Opin Genet Dev. 2017;42:68–77.

77. Lee J, Kim D-H, Lee S, Yang Q-H, Lee DK, Lee S-K, et al. A tumor suppressive coactivator complex of p53 containing ASC-2 and histone H3-lysine-4 methyltransferase MLL3 or its paralogue MLL4. PNAS. 2009;106(21):8513–8518.

78. Attar N, Kurdistani SK. Exploitation of EP300 and CREBBP Lysine Acetyltransferases by Cancer. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. mars 2017;7(3):a026534.

79. Dixon ZA, Nicholson L, Zeppetzauer M, Matheson E, Sinclair P, Harrison CJ, et al. CREBBP knockdown enhances RAS/RAF/MEK/ERK signaling in Ras pathway mutated acute lymphoblastic leukemia but does not modulate chemotherapeutic response. Haematologica. avr 2017;102(4):736-45.

80. Narlikar GJ, Sundaramoorthy R, Owen-Hughes T. Mechanisms and Functions of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Enzymes. Cell. août 2013;154(3):490-503.

81. Hodges C, Kirkland JG, Crabtree GR. The Many Roles of BAF (mSWI/SNF) and PBAF Complexes in Cancer. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. août 2016;6(8).

82. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutation of EZH2 (Y641) in Follicular and Diffuse Large B-cell Lymphomas of Germinal Center Origin. Nat Genet. févr 2010;42(2):181-5.

83. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng S-WG, Moradian A, et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. Blood. 24 févr 2011;117(8):2451-9.

84. Bantignies F, Cavalli G. Cellular memory and dynamic regulation of polycomb group proteins. Curr Opin Cell Biol. juin 2006;18(3):275-83.

85. Van der Meulen J, Speleman F, Van Vlierberghe P. The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. Epigenetics. 6 mai 2014;9(5):658-68.

86. Wang L, Shilatifard A. UTX Mutations in Human Cancer. Cancer Cell. févr 2019;35(2):168-76.

87. Walport LJ, Hopkinson RJ, Vollmar M, Madden SK, Gileadi C, Oppermann U, et al. Human UTY(KDM6C) is a male-specific Nϵ-methyl lysyl demethylase. J Biol Chem. 27 juin 2014;289(26):18302-13.

88. Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan K-P, Reinberg D, et al. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. Science. 19 oct 2007;318(5849):447-50.

89. Mallo M, Alonso CR. The regulation of Hox gene expression during animal development. Development. oct 2013;140(19):3951-63.

90. Niikawa N, Matsuura N, Fukushima Y, Ohsawa T, Kajii T. Kabuki make-up syndrome: a syndrome of mental retardation, unusual facies, large and protruding ears, and postnatal growth deficiency. J Pediatr. oct 1981;99(4):565-9.

91. Mansour AA, Gafni O, Weinberger L, Zviran A, Ayyash M, Rais Y, et al. The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. Nature. 16 août 2012;488(7411):409-13.

92. Liu J, Mercher T, Scholl C, Brumme K, Gilliland DG, Zhu N. A functional role for the histone demethylase UTX in normal and malignant hematopoietic cells. Exp Hematol. juin 2012;40(6):487-498.e3.

93. Thieme S, Gyárfás T, Richter C, Özhan G, Fu J, Alexopoulou D, et al. The histone demethylase UTX regulates stem cell migration and hematopoiesis. Blood. 28 mars 2013;121(13):2462-73.

94. Bochyńska A, Lüscher-Firzlaff J, Lüscher B. Modes of Interaction of KMT2 Histone H3 Lysine 4 Methyltransferase/COMPASS Complexes with Chromatin. Cells. 2 mars 2018;7(3):17.

95. Cho Y-W, Hong T, Hong S, Guo H, Yu H, Kim D, et al. PTIP Associates with MLL3- and MLL4-containing Histone H3 Lysine 4 Methyltransferase Complex. J Biol Chem. 13 juill 2007;282(28):20395-406.

96. Kim J-H, Sharma A, Dhar SS, Lee S-H, Gu B, Chan C-H, et al. UTX and MLL4 coordinately regulate transcriptional programs for cell proliferation and invasiveness in breast cancer cells. Cancer Res. 15 mars 2014;74(6):1705-17.

97. Wang S-P, Tang Z, Chen C-W, Shimada M, Koche RP, Wang L-H, et al. A UTX-MLL4-p300 Transcriptional Regulatory Network Coordinately Shapes Active Enhancer Landscapes for Eliciting Transcription. Molecular Cell. 20 juill 2017;67(2):308-321.e6.

98. Herz H-M, Mohan M, Garruss AS, Liang K, Takahashi Y, Mickey K, et al. Enhancer-associated H3K4 monomethylation by Trithorax-related, the Drosophila homolog of mammalian Mll3/Mll4. Genes Dev. 12 janv 2012;26(23):2604-20.

99. Ezponda T, Dupéré-Richer D, Will CM, Small EC, Varghese N, Patel T, et al. UTX/KDM6A Loss Enhances the Malignant Phenotype of Multiple Myeloma and Sensitizes Cells to EZH2 inhibition. Cell Reports. oct 2017;21(3):628-40.

100. Watanabe S, Shimada S, Akiyama Y, Ishikawa Y, Ogura T, Ogawa K, et al. Loss of KDM6A characterizes a poor prognostic subtype of human pancreatic cancer and potentiates HDAC inhibitor lethality. Int J Cancer. juill 2019;145(1):192-205.

101. Miller SA, Mohn SE, Weinmann AS. Jmjd3 and UTX Play a Demethylase-Independent Role in Chromatin Remodeling to Regulate T-Box Family Member-Dependent Gene Expression. Mol Cell. nov 2010;40(4):594-605.

102. Tie F, Banerjee R, Conrad PA, Scacheri PC, Harte PJ. Histone Demethylase UTX and Chromatin Remodeler BRM Bind Directly to CBP and Modulate Acetylation of Histone H3 Lysine 27. Mol Biol Cell. 15 juin 2012;32(12):2323-34.

103. Belotserkovskaya R, Reinberg D. Facts about FACT and transcript elongation through chromatin. Current Opinion in Genetics & Development. 1 avr 2004;14(2):139-46.

104. Wang AH, Zare H, Mousavi K, Wang C, Moravec CE, Sirotkin HI, et al. The histone chaperone Spt6 coordinates histone H3K27 demethylation and myogenesis. The EMBO Journal. 17 avr 2013;32(8):1075-86.

105. van Haaften G, Dalgliesh GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. Nat Genet. mai 2009;41(5):521-3.

106. Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. Blood. 6 oct 2011;118(14):3932-41.

107. Mar BG, Bullinger L, Basu E, Schlis K, Silverman LB, Döhner K, et al. Sequencing histone-modifying enzymes identifies UTX mutations in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. août 2012;26(8):1881-3.

108. Pawlyn C, Kaiser MF, Heuck C, Melchor L, Wardell CP, Murison A, et al. The Spectrum and Clinical Impact of Epigenetic Modifier Mutations in Myeloma. Clin Cancer Res. 1 déc 2016;22(23):5783-94.

109. Herz H-M, Madden LD, Chen Z, Bolduc C, Buff E, Gupta R, et al. The H3K27me3 Demethylase dUTX Is a Suppressor of Notch- and Rb-Dependent Tumors in Drosophila. Molecular and Cellular Biology. 15 mai 2010;30(10):2485-97.

110. Choi H-J, Park J-H, Park M, Won H-Y, Joo H-S, Lee CH, et al. UTX inhibits EMT-induced breast CSC properties by epigenetic repression of EMT genes in cooperation with LSD1 and HDAC1. EMBO Rep. oct 2015;16(10):1288-98.

111. Andricovich J, Perkail S, Kai Y, Casasanta N, Peng W, Tzatsos A. Loss of KDM6A Activates Super-Enhancers to Induce Gender-Specific Squamous-like Pancreatic Cancer and Confers Sensitivity to BET Inhibitors. Cancer Cell. mars 2018;33(3):512-526.e8.

112. Ntziachristos P, Tsirigos A, Welstead GG, Trimarchi T, Bakogianni S, Xu L, et al. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. Nature. oct 2014;514(7523):513-7.

113. Van der Meulen J, Van Roy N, Van Vlierberghe P, Speleman F. The epigenetic landscape of T-cell acute lymphoblastic leukemia. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 1 août 2014;53:547-57.

114. Van der Meulen J, Sanghvi V, Mavrakis K, Durinck K, Fang F, Matthijssens F, et al. The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1 janv 2015;125(1):13-21.

115. Ler LD, Ghosh S, Chai X, Thike AA, Heng HL, Siew EY, et al. Loss of tumor suppressor KDM6A amplifies PRC2-regulated transcriptional repression in bladder cancer and can be targeted through inhibition of EZH2. Science Translational Medicine. 22 févr 2017;9(378):eaai8312.

116. Gaudichon J, Milano F, Cahu J, DaCosta L, Martens AC, Renoir J-M, et al. Deazaneplanocin A Is a Promising Drug to Kill Multiple Myeloma Cells in Their Niche. Eckert RL, éditeur. PLoS ONE. 25 sept 2014;9(9):e107009.

117. Xu B, Konze KD, Jin J, Wang GG. Targeting EZH2 and PRC2 dependence as novel anticancer therapy. Exp Hematol. août 2015;43(8):698-712.

118. Yamagishi M, Uchimaru K. Targeting EZH2 in cancer therapy: Curr Opin Oncol. sept 2017;29(5):375-81.

119. Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholic NM, Huang K-C, Xiao Y, et al. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. Mol Cancer Ther. avr 2014;13(4):842-54.

120. Penneroux J, Itzykson R. Targeting BET bromodomains in hematological malignancies. Hématologie. janv 2017;23(1):33-42.

121. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target c-Myc. Cell. sept 2011;146(6):904-17.

122. Arons E, Zhou H, Wang Y, Edelman D, Kreitman RJ, Stevenson HS, et al. Increased Expression of Myc in Hairy Cell Leukemia, and Cell-Sensitivity to JQ1. Blood. 2 déc 2016;128(22):5112-5112.

123. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. Int J Mol Sci. 1 juill 2017;18(7).

124. Melo JV, Foroni L, Brito-Babapulle V, Luzzatto L, Catovsky D. The establishment of cell lines from chronic B cell leukaemias: evidence of leukaemic origin by karyotypic abnormalities and Ig gene rearrangement. Clin Exp Immunol. juill 1988;73(1):23-8.

125. Wilson MA, Morrissette JJD, McGettigan S, Roth D, Elder D, Schuchter LM, et al. What you are missing could matter: a rare, complex BRAF mutation affecting codons 599, 600, and 601 uncovered by next generation sequencing. Cancer Genetics. 1 juin 2014;207(6):272-5.

126. Wientjens G-JHM, Jansen JH, Wessels HW, Kibbelaar RE, Beverstock GC, Brederoo P, et al. Characterization of a New Human B Cell Line (Bonna-12) with Trisomy 9 and Trisomy 12 Chromosomal Abnormality. Leuk Lymphoma. 1 janv 1991;5(5-6):415-22.

127. Klier M, Anastasov N, Hermann A, Meindl T, Angermeier D, Raffeld M, et al. Specific lentiviral shRNA-mediated knockdown of cyclin D1 in mantle cell lymphoma has minimal effects on cell survival and reveals a regulatory circuit with cyclin D2. Leukemia. nov 2008;22(11):2097-105.

128. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 17 août 2012;337(6096):816-21.

129. Guernet A, Grumolato L. CRISPR/Cas9 editing of the genome for cancer modeling. Methods. mai 2017;121-122:130-7.

130. Romagnoli M, Séveno C, Bataille R, Barillé-Nion S. Survivine en cancérologie: Aspects moléculaires et applications thérapeutiques. médecine/sciences. oct 2008;24(10):821-7.

131. Sun B, Fiskus W, Qian Y, Rajapakshe K, Raina K, Coleman KG, et al. BET protein proteolysis targeting chimera (PROTAC) exerts potent lethal activity against mantle cell lymphoma cells. Leukemia. févr 2018;32(2):343-52.

132. Tiacci E, Pucciarini A, Bigerna B, Pettirossi V, Strozzini F, Martelli MP, et al. 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(22):5332–5333.

133. Hong S, Cho Y-W, Yu L-R, Yu H, Veenstra TD, Ge K. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. PNAS. 20 nov 2007;104(47):18439-44.

134. Kato H, Asamitsu K, Sun W, Kitajima S, Yoshizawa-Sugata N, Okamoto T, et al. Cancer-derived UTX TPR mutations G137V and D336G impair interaction with MLL3/4 complexes and affect UTX subcellular localization. Oncogene. avr 2020;39(16):3322-35.

135. Ho AS, Kannan K, Roy DM, Morris LGT, Ganly I, Katabi N, et al. The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. Nat Genet. 19 mai 2013;45(7):791-8.

136. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. Trends Immunol. déc 2013;34(12):592-601.

137. Guo B, Zhang L, Chiorazzi N, Rothstein TL. IL-4 rescues surface IgM expression in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 28 juill 2016;128(4):553-62.

138. Uotila LM, Aatonen M, Gahmberg CG. Integrin CD11c/CD18 α-Chain Phosphorylation Is Functionally Important. J Biol Chem. 15 nov 2013;288(46):33494-9.

139. Umit EG, Baysal M, Durmus Y, Demir AM. CD11c expression in chronic lymphocytic leukemia revisited, related with complications and survival. International Journal of Laboratory Hematology. 2017;39(5):552-6.

140. Kikutani H, Suemura M, Owaki H, Nakamura H, Sato R, Yamasaki K, et al. Fc epsilon receptor, a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells before isotype switching. J Exp Med. 1 nov 1986;164(5):1455-69.

141. Acharya M, Borland G, Edkins AL, Maclellan LM, Matheson J, Ozanne BW, et al. CD23/FcεRII: molecular multi-tasking. Clin Exp Immunol. oct 2010;162(1):12-23.

142. Wang F, Gregory CD, Rowe M, Rickinson AB, Wang D, Birkenbach M, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. Proc Natl Acad Sci USA. mai 1987;84(10):3452-6.

143. Testa U, Pelosi E, Castelli G. CD123 as a Therapeutic Target in the Treatment of Hematological Malignancies. Cancers. 12 sept 2019;11(9).

144. Hernando H, Gelato KA, Lesche R, Beckmann G, Koehr S, Otto S, et al. EZH2 Inhibition Blocks Multiple Myeloma Cell Growth through Upregulation of Epithelial

Tumor Suppressor Genes. Molecular Cancer Therapeutics. 1 févr 2016;15(2):287-98.

145. Popovic R, Martinez-Garcia E, Giannopoulou EG, Zhang Q, Zhang Q, Ezponda T, et al. Histone methyltransferase MMSET/NSD2 alters EZH2 binding and reprograms the myeloma epigenome through global and focal changes in H3K36 and H3K27 methylation. PLoS Genet. sept 2014;10(9):e1004566.

146. Amatangelo M, Garipov A, Li H, Conejo-Garcia J, Speicher D, Zhang R. Three-dimensional culture sensitizes epithelial ovarian cancer cells to EZH2 methyltransferase inhibition. Cell Cycle. 10 juin 2013;12(13):2113-9.

UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

Annexes

UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

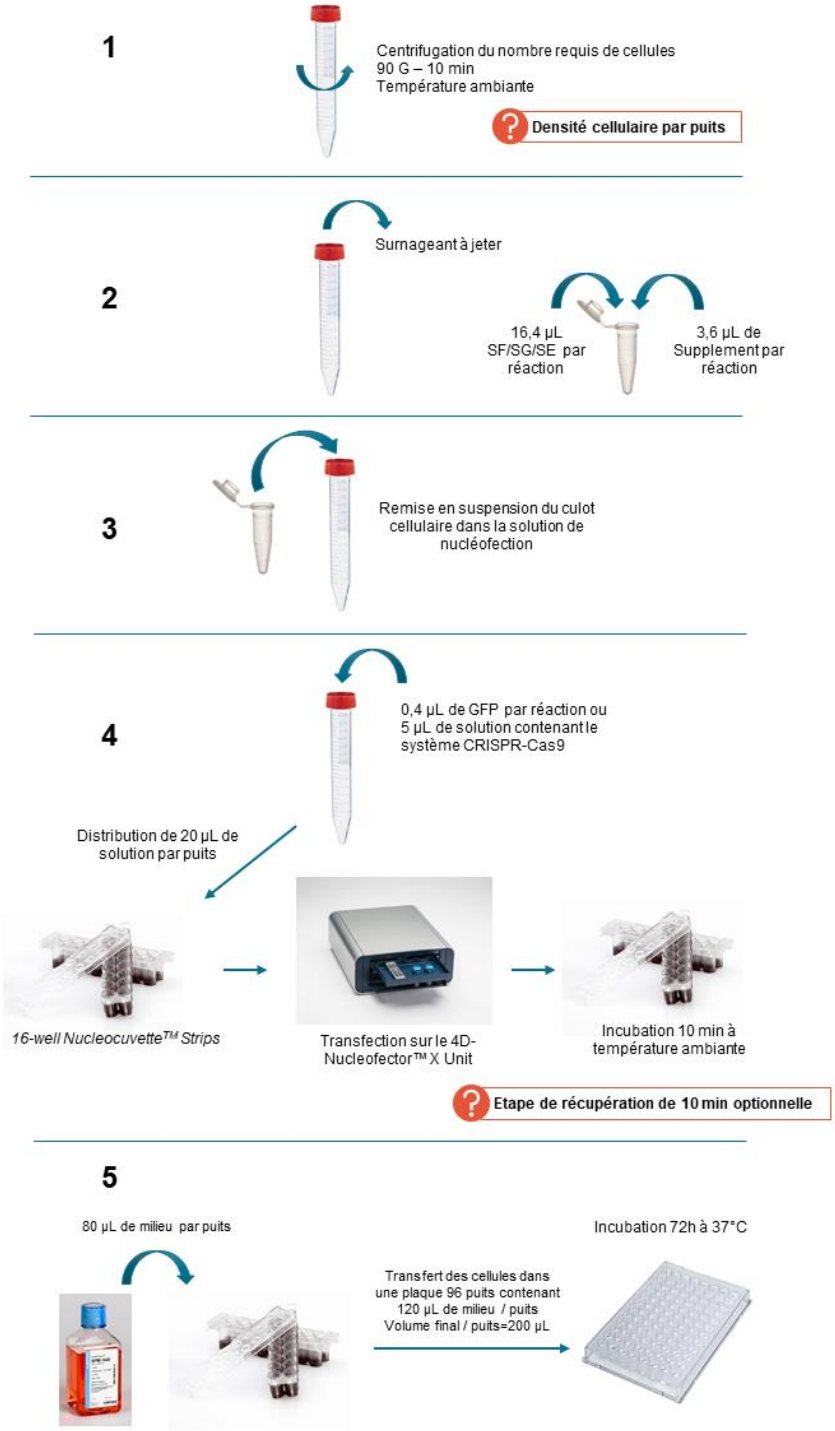
U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

Annexe 1 : Fréquence des variants génétiques d'intérêt dans la leucémie à tricholeucocytes et sa forme variante dans les études de séquençage à haut débit

	Leucémie à tricholeucocytes				Forme variante de la leucémie à tricholeucocytes			
Etude	Dietrich *et al.* Waterfall *et al.* Tiacci *et al.* Weston-Bell *et al.*	Durham *et al.*	Maitre *et al.*	**Total**	Dietrich *et al.* Waterfall *et al.* Tiacci *et al.* Weston-Bell *et al.*	Durham *et al.*	Maitre *et al.*	**Total**
Design	**Exome complet**	**Panel de 585 gènes**	**Panel de 21 gènes**		**Exome complet**	**Panel de 585 gènes**	**Panel de 21 gènes**	
Voie des MAP-kinases								
BRAF	10/12 (83,3%)	53/53 (100%)	18/20 (90%)	81/85 (95,3%)	0/7 (0%)	0/8 (0%)	0/4 (0%)	0/19 (0%)
MAP2K1	2/12 (16,7%)	0/53 (0%)	1/20 (5%)	3/85 (3,5%)	3/7 (42,9%)	3/8 (37,5%)	2/4 (50%)	8/19 (42,1%)
Cycle cellulaire								
CDKN1B	3/12 (25%)	6/53 (11,3%)	2/20 (10%)	11/85 (12,9%)	0/7 (0%)	0/8 (0%)	0/4 (0%)	0/8 (0%)
CCND3	0/12 (0%)	0/53 (0%)	NA	0/65 (0%)	1/7 (14,3%)	1/8 (12,5%)	NA	2/15 (13,3%)
TP53	0/12 (0%)	1/53 (1,9%)	0/20 (0%)	1/85 (1,2%)	2/7 (28,6%)	3/8 (37,5%)	0/4 (0%)	5/19 (26,3%)
Voie NF-κB								
KLF2	0/12 (0%)	NA	3/20 (15%)	3/32 (9,4%)	0/7 (0%)	NA	0/4 (0%)	0/11 (0%)
Spliceosome								
U2AF1	0/12 (0%)	0/53 (0%)	0/20 (0%)	0/85 (0%)	2/7 (28,6%)	1/8 (12,5%)	0/4 (0%)	3/19 (15,8%)
Régulateurs épigénétiques								
KMT2C	0/12 (0%)	8/53 (15,1%)	NA	8/65 (12,3%)	0/7 (0%)	2/8 (25%)	NA	2/15 (13,3%)
EZH2	1/12 (8,3%)	1/53 (1,9%)	0/20 (0%)	2/85 (2,4%)	0/7 (0%)	0/8 (0%)	0/4 (0%)	0/19 (0%)
ARID1A	2/12 (16,7%)	1/53 (1,9%)	1/20 (5%)	4/85 (4,7%)	1/7 (14,3%)	0/8 (0%)	1/4 (25%)	2/19 (10,5%)
ARID1B	2/12 (16,7%)	1/53 (1,9%)	1/20 (5%)	4/85 (4,7%)	0/7 (0%)	1/8 (12,5%)	0/4 (0%)	1/19 (5,3%)
CREBBP	2/12 (16,7%)	3/53 (5,7%)	1/20 (5%)	6/85 (7,1%)	0/7 (0%)	1/8 (12,5%)	1/4 (25%)	2/19 (10,5%)
KDM6A	2/12 (16,7%)	0/53 (0%)	0/20 (0%)	2/85 (2,4%)	0/7 (0%)	1/8 (12,5%)	2/4 (50%)	3/19 (15,8%)

Annexe 2 : Protocole de transfection avec la technologie Nucleofector™



Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit Macherey-Nagel NucleoSpin® Tissue

2 Pre-lyse sample				180 µL T1 25 µL Proteinase K 56 °C, 1–3 h
3 Lyse sample				200 µL B3 70 °C, 10 min
4 Adjust DNA binding conditions				210 µL 96–100 % ethanol
5 Bind DNA				Load all 11,000 x *g*, 1 min
6 Wash silica membrane			1st wash 2nd wash	500 µL BW 600 µL B5
	1st and 2nd			11,000 x *g*, 1 min
7 Dry silica membrane				11,000 x *g*, 1 min
8 Elute highly pure DNA				100 µL BE RT, 1 min 11,000 x *g*, 1 min

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/DO280 ≥ 1,8 et DO260/DO230 ≥ 2.

Annexe 4 : Séquence cible du système CRISPR-Cas9 dans l'exon 4 de *KDM6A* et amorces utilisées pour le Surveyor® Nuclease Assay

ATTGCGGATCTCTGAATATGATATCCATGGCCTTTTGTTGGAGAATCTCTGCATTTTTTGGTCAGATTGCC
TGAACAACATCAAGTGTTGAGTGAGAGAGTTGAGGGAGCCAATTGCTTCTCAAATAGTTTTTATCCTGGTC
TTCCATATCTTAGCTTGTGAATTGTAAACCACAAATTAAAAAAATCCTTTTCTAGCTGATCAGAAAAATATTA
TGCCCCCATGTTTTCATCTAGTAGTCTTATGGGCTTCTTTTTATATCTAACTCTCTTAATCCTCCACGAGTT
TTGATCTTTGAGGAAGGTCGAGTTGATCTAAGGGGTTAGCCTAGATGCTGTTCAAGTGCAGATCTGAGAT
TTGACCATGGTTTTACGTTTCTGAACTGAGGGGGGCCCAGAATTTTAAGTTGTTTGGTCTGAAATATCACT
ATCTACTGGGAGGTGGGTGTGGTGGGAATCTTGTTACCGTGTTTGTTAAGTGTATTATTGACTTTAAAGTG
AGACATAATTATGACTCATAATTATTTTCCTTTCAGCATTATCTGCATACCAGAGGTACTACAGTTTACAG
TCTGACTACTGGAAGGTTAGTGTACATTTGCATGCTGATTTCATGTTTGTGTTTTGGGCAGATTATTGCCA
ATTATACTCAAAATTAATTGAGCTCTTGCTTTTTTTTGTTAATTACTTAAAATATTGCTTCTAGGGGAAAGGT
ATTGGAAAAGGGTTGAGAGTATTTATGTTTGTGCTGTCTTGTATGACTCTCCTTGTATTTTATTAAGAATTA
GAGTCCTCTGACACATTTTACTGGTCAAATGTAATAGAAGTGTGATAAGTAAAAATCAAGCAAAACTAAAC
AAATAACAATAACAAAATGATTCCTTGGTTTTCTTTTCTAAAGTTGGTACCTGGGAGTAAAAGAAGGCTGA
AGACGTGTATATCAGGCTAAAATGGGAAGGTGTAATGGGAAAGTTATGATAAACTCTTTCTTGGTGTACTC
TGTTTATAATTGGAGCTTTGA

En bleu, c'est la séquence de l'exon 4. En noir, ce sont les séquences introniques flanquantes. Soulignée, c'est la séquence cible du crRNA. Surligné en bleu, c'est le motif PAM (NGG) avec, en vert, le site de coupure de l'endonucléase. En rose, ce sont les séquences du couple d'amorces utilisées pour le Surveyor® nuclease assay. La taille attendue du fragment amplifié est de 515 pb. La taille attendue des fragments obtenus après digestion par la nucléase est de 356 pb et 182 pb.

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.

UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

TITRE

EFFETS FONCTIONNELS DES MUTATIONS DE KDM6A DANS LA LEUCEMIE A TRICHOLEUCOCYTES

Résumé

La leucémie à tricholeucocytes (HCL) et sa forme variante (HCL-v) sont des syndromes lymphoprolifératifs B caractérisés par des mutations de *BRAF* et de *MAP2K1* responsables d'une activation anormale de la voie des MAP-kinases. Des mutations additionnelles à ces anomalies drivers ont été identifiées. Nous nous sommes intéressés au gène *KDM6A* qui code pour une lysine déméthylase exerçant un rôle de suppresseur de tumeur. Sa perte d'expression sensibiliserait les cellules tumorales aux inhibiteurs d'EZH2, une méthyltransférase. Afin d'étudier l'impact fonctionnel de l'inactivation de *KDM6A* dans la HCL, nous avons transfecté un système CRISPR-Cas9 ciblant l'exon 4 du gène dans la lignée cellulaire JVM-3. La perte d'expression de *KDM6A* dans cette lignée favorise l'activation de la voie des MAPK sans modifier les capacités proliférative des cellules, ni leur sensibilité aux inhibiteurs de BRAF. Les cellules éditées présentent une meilleure résistance à la privation en nutriments concordante avec une augmentation de l'expression de la survivine. Il n'a pas été observé de sensibilité accrue des cellules modifiées aux thérapies ciblant l'épigénétique incluant les inhibiteurs d'EZH2. L'inactivation de KDM6A paraît ainsi concourir à l'activation de la voie oncogénique des MAPK dans la HCL mais modifie peu les capacités des tricholeucocytes et leur réponse aux chimiothérapies et thérapies ciblées.

TITLE

FUNCTIONAL EFFECTS OF KDM6A MUTATIONS IN HAIRY CELL LEUKEMIA

Summary

Hairy cell leukemia (HCL) and its variant form (HCL-v) are B-cell lymphoproliferative disorders characterized by *BRAF* and *MAP2K1* mutations responsible of abnormal activation of MAP-kinases signaling pathway. Additional mutations to these driver anomalies have been identified. We are interested in the *KDM6A* gene which codes for a lysine demethylase exerting a role of tumor suppressor. Its loss of expression would sensitize tumor cells to inhibitors of EZH2, a methyltransferase. In order to study the functional impact of the inactivation of *KDM6A* in HCL, we transfected a CRISPR- Cas9 system targeting exon 4 of the gene in the JVM-3 cell line. The loss of expression of KDM6A in this line promotes activation of the MAPK pathway without modifying the proliferative capacities of the cells, nor their sensitivity to BRAF inhibitors. The edited cells show better resistance to nutrient deprivation, consistent with an increase in the expression of survivin. No increased sensitivity of the modified cells to epigenetic therapies including EZH2 inhibitors has been observed. The inactivation of *KDM6A* thus appears to contribute to the activation of the oncogenic pathway of MAPK in HCL but does little to modify the capacities of the hairy-cells and their response to chemotherapies and targeted therapies.

Mots-clés

Leucémie à tricholeucocytes – Forme variante de la leucémie à tricholeucocytes – KDM6A – UTX – Epigénétique – Inhibiteurs d'EZH2

Nom et Prénom de l'auteur : Wiber Margaux