



Séquençage ciblé en tant qu'outil diagnostique et pronostique dans le lymphome à cellules du manteau

Sarah Bertrand

► To cite this version:

Sarah Bertrand. Séquençage ciblé en tant qu'outil diagnostique et pronostique dans le lymphome à cellules du manteau. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV033 . tel-02182943

HAL Id: tel-02182943

<https://theses.hal.science/tel-02182943>

Submitted on 14 Jul 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie du développement-Oncogénèse**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Sarah BERTRAND

Thèse dirigée par **Pr. Mary CALLANAN**

préparée au sein de l'équipe « **Génétique et Epigénétique des cancers lymphoïdes** » **Institute for Advanced Biosciences**-Centre de Recherche INSERM U1209-CNRS, UMR 5309, Université Grenoble Alpes dans l'**Ecole Doctorale Chimie Science du Vivant**

Séquençage ciblé en tant qu'outil diagnostique et pronostique dans le lymphome à cellules du manteau

Thèse soutenue publiquement le **13 juillet 2017**
devant le jury composé de :

Pr. Marie-Hélène DELFAU-LARUE

PU-PH, INSERM U955- Université Paris-Est, Marne-la-Vallée-CHU Henri Mondor, Rapporteur

Pr. Catherine THIEBLEMONT

PU-PH, Université Paris VII, CHU Paris-GH St Louis Lariboisière F.Widal, Hôpital Saint Louis, Rapporteur

Dr. Romain GUIEZE

PH, Clermont-Ferrand, CHU ESTAING, Examineur

Pr. Mary CALLANAN

PU-PH, INSERM 1209-Université Grenoble Alpes, CHU de Grenoble, Examinatrice

Pr. Stefan NONCHEV

Enseignant-Chercheur, INSERM 1209-Université Grenoble Alpes, CHU de Grenoble, Président du jury

invités :

Dr. Anouk EMADALI

Chercheur, INSERM 1209-Université Grenoble Alpes, CHU de Grenoble

Mr. Yannis DUFFOURD

Responsable de la Business Unit OrphanOmiX, Université de Bourgogne, CHU de Dijon



Remerciements,

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de thèse, le Pr Mary CALLANAN pour son enthousiasme débordant et sa créativité mais également pour nos longues discussions scientifiques lors de nos fameuses nocturnes du lundi soir ainsi que pour m'avoir aidée à construire davantage mon esprit critique. Mary, je n'oublierai pas que « absence of evidence is not evidence of absence » and « slow and steady wins the race ». Go raibh maith agat !

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements à mes rapportrices de thèse, le Pr Marie-Hélène DELFAU et le Pr Catherine THIEBLEMONT pour leur disponibilité et leurs remarques qui ont contribué à améliorer la qualité de ce mémoire. J'adresse également mes remerciements au Pr Stefan NONCHEV qui préside mon jury ainsi qu'à mon examinateur, le Dr Romain GUIEZE et à Mr Yannis DUFFOURD qui me font la joie de leur présence. Mes remerciements vont également aux membres de mon Comité de Suivi de Thèse, le Pr Claire VOUREC ainsi que le Pr Olivier TOURNILHAC pour leurs précieux conseils dans le déroulement de ma thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble de l'équipe de recherche du Pr Mary CALLANAN. Merci au Dr Anouk EMADALI qui a co-encadré mon travail de thèse, pour son optimisme, son aide et son écoute tout au long de ces années ainsi que pour la relecture de mon manuscrit de thèse. Merci au Dr Thierry BONNEFOIX pour nos discussions scientifico-philosophiques, pour ses jeux sémantiques, Ô Toi qui vales si aisément avec les mots/maux ainsi que pour ce rendez-vous réconfortant quasi quotidien du chocolat noir 100% Suisse de 16h pétante ! Les thésards ont besoin de beaucoup de chocolat, c'est « typique »... et également pour son travail de relecture. Merci à Azadeh HAJMIRZA, mon amie thésarde pour son soutien, pour sa gourmandise (pour tous les restos auxquels tu m'as invitée), pour sa « girly touch » (je crois n'avoir jamais vu autant de frénésie de la mode) et pour sa « iranian touch » (j'ai adoré connaître davantage tes origines). Merci à Samuel DULEY, mon binôme

NGS, pour son aide technique, son soutien, ses paroles réconfortantes et son sens de l'humour un peu décalé. Merci à Sieme HAMAIDIA, le soleil de notre équipe, pour sa joie de vivre, son humeur toujours constante et son écoute. Merci à Patricia BETON pour sa sagesse et son écoute. Merci, enfin à Cédric ARISDAKESSIAN, arrivé très récemment dans notre équipe, pour ses compétences en bioinformatique, sa bonne humeur et son légendaire « Waouh » qui me fait tant rire.

Je tiens à remercier également chaleureusement, l'ensemble de l'équipe hospitalière en Onco-Hématologie du Pr Mary CALLANAN qui m'a accueillie à bras ouverts dès le début de ma thèse. Merci, tout d'abord à Martine CHAUVET qui m'a prise sous son aile dès le début de ma thèse. Tu m'as formée à la biomoléculaire et je me rappellerai pendant longtemps de ta présence auprès de moi lorsque mes expérimentations n'en finissaient pas, le soir dans un IBP désert et notre enthousiasme face à mes premiers résultats de séquençage Sanger puis NGS. Merci pour ton acharnement scientifique mais aussi pour ta sensibilité qui te caractérisent si bien. Merci au Dr Rémy GRESSIN pour son expertise et ses encouragements. Merci à Céline SUCHAUD-MARTIN pour son amitié, son enthousiasme, son optimisme à toutes épreuves et sa ténacité. Tu as su me redonner courage à chaque fois que je doutais de moi. Merci à Isabelle PUTAUD pour sa sagesse et son esprit critique. Merci à toutes les deux pour tout ce chemin accompli dans le monde du NGS. Merci à Emilie MONDIBURU pour sa bonne humeur et son sens de l'humour hors du commun. Merci à Caroline MEDARD et Delphine BAILLY pour leur gentillesse et leur dynamisme ainsi qu'à Jean-Jacques OLLIER pour ses paroles encourageantes et pour nos discussions autour de la montagne. Merci à Estelle GIMENEZ pour sa rigueur et ses conseils. Merci également à tous les membres de l'équipe hospitalière de Cytogénétique Hématologique du Dr Christine LEFEBVRE. Merci, enfin à Camille et à Laurianne, je vous souhaite tous mes vœux de bonheur avec vos petits-bouts qui vont naître très certainement pendant ma soutenance de thèse !

J'adresse toute ma gratitude à l'Institut Albert Bonniot qui m'a accueillie alors que j'étais une toute jeune étudiante en deuxième année de Licence et qui m'a vue « grandir » jusqu'à la fin de ma thèse. Je tiens à remercier notre directeur le Professeur Pierre HAINAUT pour ses conseils avisés ainsi que le Dr Saadi KHOCHBIN qui m'a donné le goût de la recherche lors de mes nombreux stages dans son équipe ainsi que pour l'opportunité qu'il m'a donnée lorsque j'ai présenté mes travaux au Japon. Ce voyage a vraiment été important pour moi !

Je n'oublie pas également le personnel administratif et technique et tout particulièrement Dalenda, Michaël et Natacha pour leur disponibilité, leur soutien et leurs paroles réconfortantes. Merci également aux autres thésards qui contribuent à l'ambiance IABzienne et tout spécialement Azadeh, Mathieu, Mina, Alexander, Emeline, Laure et Sivan. J'ai rarement pu participer à vos soirées mais je garde un très bon souvenir des barbecues, des petites pauses café et de la soirée des 30 ans d'Azadeh.

Je tiens à remercier également la plateforme transversale de Biologie Moléculaire du Pr Julien FAURE et tout particulièrement le Dr Amandine CHATAGNON, ingénieur responsable de l'activité NGS, pour son expertise et sa disponibilité.

Mille mercis à mon groupe d' « Amis d'Antan » et « leurs pièces rapportées », nous nous connaissons depuis le lycée voire même le collège pour certains d'entre vous et nous avons toujours été présents les uns pour les autres, malgré les emplois du temps chargés de chacun. Merci à Quentin, Manu, Virginie, François, Clément, Seb, Alex, Paul, Topi, Clélia, Yoan, Dorothée, Joris, Nannan, TERENCE et tout particulièrement à Claire, Elodie et Audrey pour leur soutien inconditionnel. Merci également à Charlotte dont l'amitié est plus récente mais tout aussi robuste, pour son soutien et son écoute durant ces longues heures de marches à discuter ensemble. Tu as toujours cru en moi et tu m'as aidée à me dépasser !

Je remercie du fond du cœur, ma famille qui a toujours été là pour moi. Merci à ma mère, pour son amour immense, son soutien et sa patience. Merci aussi pour m'avoir aidée à être ce que je suis aujourd'hui et pour avoir toujours cru en moi ! Merci à mes frères Benoît et Bruno pour leur amour et leur soutien. Benoît, tu as mis un peu de temps à comprendre qu'une thèse de Biologie ne signifie pas forcément travailler sur les pissenlits mais je ne t'en veux pas trop, promis ! Merci à Bruno pour m'avoir autant choyée (être la benjamine de notre fratrie a parfois des avantages). Merci à ma belle-sœur Priscilla, pour son soutien, pour toutes ses marques d'affection (colis, fleurs, cartes et longs mails) et ses paroles réconfortantes.

Je remercie également du fond du cœur mes beaux-parents « Bonne-Maman et Grappy » pour leur soutien inconditionnel, leur amour et toutes ces nombreuses heures à m'écouter parler de mes joies mais aussi de mes peines et de mes doutes dans votre si jolie maison, je n'oublierai jamais ces moments. Vous m'avez accueillie dans votre famille comme votre propre fille et j'en suis profondément touchée. Merci à mes beaux-frères Thomas, Fred

et Noche et tout particulièrement à Clem pour son écoute lors des moments difficiles. Merci enfin, à mes belles-sœurs Chon, Géraldine, Laurence, Alysson et à Julie.

« Last but not least », mes mots ne seront sûrement pas assez forts pour exprimer tout mon amour et ma reconnaissance envers mon mari, Simon et mes deux petits garçons Samuel et Henri. Pitou, tu as toujours été là pour moi depuis maintenant onze années. Je ne sais comment te remercier pour ton amour, ton soutien inconditionnel et ta patience. *Je t'aime*. Samuel et Henri, vous êtes les soleils de ma vie et vos sourires m'ont réchauffé le cœur tout au long de ma thèse. Je vous aime.

À mon Père

“Seul l'arbre qui a subi les assauts du vent est vraiment vigoureux, car c'est dans cette lutte que ses racines, mises à l'épreuve, se fortifient. ” Sénèque- lettre à Lucilius

Résumé

Le lymphome à cellules du manteau (LCM) est un sous-type de lymphome malin non-Hodgkiniens rare et cliniquement agressif dont le pronostic défavorable (médiane de survie globale 4-5 ans) et les rechutes fréquentes constituent un véritable challenge pour les cliniciens malgré les avancées thérapeutiques de cette dernière décennie. L'émergence de nouvelles technologies telles que le séquençage nouvelle génération (NGS) apporte de plus en plus de connaissances sur la complexité biologique de cette maladie en identifiant de manière globale les perturbations génétiques chez les patients. Dans ce contexte, notre travail a consisté à créer un outil de séquençage ciblé couvrant 44 gènes mutés de façon récurrente dans le LCM. La précision et la robustesse de cet outil ont été démontrées via l'étude d'une cohorte de 30 patients dont les fréquences des mutations génétiques peuvent être corrélées à celles déjà publiées dans des études de cohorte de taille similaire. De plus, l'étude d'un sous-groupe de patients sensibles vs réfractaires à un traitement RiBVD (Rituximab, Bendamustine, Velcade et Dexaméthasone) a permis de montrer la corrélation entre les mutations TP53, MLL2 et MEF2B et la résistance à cette thérapie. Il a d'ailleurs été démontré dans 63 autres cas de LCM, l'impact des mutations TP53 sur la survie dû à une diminution de la fonction immunitaire cytotoxique mais aussi à l'augmentation des signatures NFkB et MYC. Notre outil de séquençage ciblé apparaît donc comme un outil au potentiel intéressant pour la prise en charge des patients LCM ainsi que pour la découverte de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans cette maladie.

Abstract

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare and clinically aggressive subtype of non-Hodgkin lymphoma that shows very poor prognosis (median overall survival 4-5 years) and frequent relapses and constitute a challenge for clinicians despite therapeutic advances. The emergence of new technologies such as next-generation sequencing (NGS) brings new insights into the biological complexity of this disease by identifying genetic perturbations in patients. In this context, we set out to design, implement and test a targeted deep sequencing gene panel covering 44 recurrently mutated genes for use in the clinical setting in MCL. We demonstrate the accuracy and robustness of our tool by studying a cohort of 30 MCL patients. Mutation frequencies comply with published cohorts of similar size. In addition, by studying a subgroup of refractory compared to long term remission patients treated by R-BVD (Rituximab, Bendamustine, Velcade and Dexamethasone), we identify mutations in TP53, MLL2 et MEF2B genes as characteristic of refractory disease. TP53 mutation screening in a further 63 MCL cases showed short survival due to reduced cytotoxic immune function and gain of NF- κ B and a MYC-regulated core stem cell pathways. Thus our sequencing tool presents interesting potential for MCL patient management and for discovery of novel molecular mechanisms in this disease.

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Remerciements | 1 |
| Résumé | 7 |
| Abstract..... | 8 |
| Sommaire | 9 |
| Liste des figures | 12 |
| Abréviations..... | 14 |
| Chapitre 1- Physiologie des cellules B | 24 |
| 1. Hématopoïèse-les principes généraux | 24 |
| 2. Différenciation lymphoïde et myéloïde | 25 |
| 3. Ontogénie des lymphocytes B | 26 |
| 3.1 Lymphopoïèse B médullaire : phase antigène indépendante | 27 |
| a) Mécanismes généraux | 27 |
| i. Réarrangements des gènes d'immunoglobulines | 27 |
| ii. Caractéristiques structurales du récepteur aux cellules B..... | 30 |
| b) Contrôle transcriptionnel de la lymphopoïèse B | 31 |
| i. IKAROS | 31 |
| ii. PU.1 | 32 |
| iii. E2A et EBF..... | 33 |
| iv. PAX5 | 33 |
| v. LEF1 | 34 |
| vi. MEF2 | 35 |
| 3.2 Immunopoïèse dans les organes lymphoïdes secondaires : phase antigène dépendante | 36 |
| a) Architecture histologique des organes lymphoïdes secondaires | 36 |

| | |
|---|-----------|
| b) Hypermutation somatique et commutation de classe | 36 |
| Chapitre 2- Lymphome à cellules du manteau | 39 |
| 1. Caractéristiques cliniques..... | 39 |
| 1.1 Classification et origine cellulaire..... | 39 |
| 1.2 Manifestations cliniques | 40 |
| 1.3 Diagnostic | 40 |
| a) Immunophénotypage par cytométrie de flux..... | 40 |
| b) Aspects anatomo-pathologiques..... | 41 |
| 2. Des thérapies variées : du traitement conventionnel aux nouvelles thérapies ciblées | 44 |
| 2.1 Traitements de première ligne..... | 44 |
| a) Traitement intensif des patients jeunes et sans comorbidité | 44 |
| b) Traitements conventionnels..... | 45 |
| c) Traitements des patients âgés | 46 |
| 2.2 Traitement dans les cas de rechutes ou réfractaires | 46 |
| 2.3 Nouvelles options thérapeutiques | 47 |
| 3. Pathogenèse moléculaire | 50 |
| 3.1 Aberrations chromosomiques | 50 |
| 3.2 Paysage mutationnel du lymphome à cellules du manteau-vue générale | 53 |
| 3.3 Mutations génétiques affectant la signalisation cellulaire | 62 |
| a) Mutations au sein de complexes intervenant dans la réparation de l'ADN | 62 |
| b) Mutations affectant l'ubiquitination..... | 63 |
| i. Mutations UBR5 | 63 |
| ii. Mutations FBXO25 et HAX1 | 65 |
| c) Mutations affectant le cycle cellulaire..... | 66 |
| 3.4 Mutations génétiques affectant l'expression génique | 68 |
| a) Mutations au sein de facteurs de transcription | 68 |

| | |
|--|------------|
| i. Mutation NOTCH1 | 68 |
| ii. Mutation TP53 | 71 |
| 3.5 Mutations génétiques affectant le microenvironnement cellulaire – Cas de l’adhésion cellulaire | 73 |
| 3.6 Impact des mutations au sein de régulateurs épigénétiques sur l’organisation de l’épigénome dans le lymphome à cellules du manteau | 74 |
| Arguments scientifiques..... | 78 |
| Résultats | 82 |
| Discussion et perspectives..... | 107 |
| Bibliographie | 110 |
| Annexes | 121 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Modèle hiérarchique de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse adulte..... | 25 |
| Figure 2. Différenciation des lymphocytes B..... | 28 |
| Figure 3. Mécanisme de réarrangements V(D)J..... | 29 |
| Figure 4. Représentation schématique du récepteur des cellules B (BCR)..... | 30 |
| Figure 5. Contrôle transcriptionnel de la différenciation des lymphocytes B..... | 34 |
| Figure 6. Mécanisme de commutation de classe..... | 38 |
| Figure 7. Origine cellulaire du lymphome à cellules du manteau..... | 39 |
| Figure 8. Représentation schématique des différentes formes histologiques du lymphome à cellules du manteau..... | 43 |
| Figure 9. Algorithme décisionnel de traitements proposés pour les patients nouvellement diagnostiqués pour un lymphome à cellule du manteau | 45 |
| Figure 10. Algorithme décisionnel de traitements pour les patients atteints de lymphome à cellules du manteau en rechute ou réfractaire au traitement appliqué | 47 |
| Figure 11. Nouvelles thérapies ciblant les principales voies de signalisation cellulaire dans le lymphome à cellules du manteau..... | 49 |
| Figure 12. Caractéristiques biologiques du lymphome à cellules du manteau..... | 51 |
| Figure 13. Les diverses fonction de la cycline D1..... | 52 |
| Figure 14. WES effectué sur 29 cas et 6 lignées cellulaires dérivées de lymphomes à cellules du manteau (MCL)..... | 55 |
| Figure 15. Le séquençage exonique du lymphome à cellules du manteau révèle des gènes mutés de façon récurrente..... | 58 |
| Figure 16. Voie de signalisation cellulaire issue du BCR..... | 60 |

| | |
|---|----|
| Figure 17. Survie sans progression en fonction du statut mutationnel des gènes TP53 et KMT2D (MLL2) chez des patients jeunes atteints de lymphomes à cellules du manteau et traités par R-CHOP, cytarabine et greffe autologue..... | 61 |
| Figure 18. Distribution des mutations du gène ATM détectées par WES dans des cas de lymphome à cellules du manteau..... | 63 |
| Figure 19. Distribution des mutations UBR5 observées dans le lymphome à cellules du manteau et dans les cancers solides (sein, reins, prostate, poumon et intestin)..... | 65 |
| Figure 20. Mécanisme d'épissage à la base de la production du transcrit cycline D1b..... | 67 |
| Figure 21. Distribution des mutations NOTCH1 observées dans le lymphome à cellules du manteau..... | 69 |
| Figure 22. Les mutations NOTCH1 sont associées à un plus mauvais pronostic..... | 70 |
| Figure 23. Distribution des mutations TP53 dans le lymphome à cellules du manteau..... | 72 |
| Figure 24. Courbes de survie de 119 cas de lymphomes à cellules du manteau..... | 73 |

Abréviations

A/

| | |
|---------------|---|
| aCGH | a rray C omparative G enomic H ybridization |
| AIB1 | N uclear receptor CO Activator 3 (NCOA3) |
| AID | A ctivation I nduced cytidine D eaminase |
| AKT | Protéine Kinase B |
| AR | A ndrogen R eceptor |
| ARNmi | m icro ARN |
| ATM | A taxia T elangiectasia M utated |
| ATMIN | ATM I nteractor |
| ATP11C | ATP ase phospholipid transporting 11C |

B/

| | |
|--------------|--|
| BAK | B -cell lymphoma-2 homologous A ntagonist K iller |
| BAX | B -cell lymphoma-2-Associated X protein |
| BCL6 | B -cell CLL/L ymphoma 6 |
| BCL2 | B -Cell L ymphoma protein-2 |
| BCR | B Cell R eceptor |
| BIRC2 | B aculoviral IAP R epet Containing 2 |
| BIRC3 | B aculoviral IAP R epet Containing 3 |
| BMYP | MYB proto-oncogene like 2 |
| BRCA1 | B Reast C Ancer 1 |

| | |
|----------------------|--|
| BTK | B ruton T yrosine K inase |
| C/ | |
| CCND 1 | Cy cli Ne D 1 |
| CCND 2 | Cy cli Ne D 2 |
| CCND 3 | Cy cli Ne D 3 |
| CD | C luster de D ifférenciation |
| CDH8 | CaD Herin 8 |
| CDK | C yclin D ependent K inase |
| CDKN2A | C yclin D ependent K inase i Nhibitor 2A |
| CDR | C omplementary D etermining R egion |
| C/EBPβ | CCAAT/Enhancer B inding P rotein beta |
| C_H | C onstant domain from H heavy chain |
| CHD2 | C hromodomain H elicase DNA binding protein 2 |
| CHEK1 | CHE ckpoint K inase 1 |
| CHEK2 | CHE ckpoint K inase 2 |
| ChIP Seq | I mmuno P réciptitation de la C hromatine couplée à un S équençage à haut débit |
| CHOP | C yclophosphamide, H ydroxydaunorubicin (doxorubicine), O nconvin (vincristine) et P rednisone |
| C_L | C onstant domain from L ight chain |
| CLL | C hronic L ymphoid L eukemia |
| CLP | C ommon L ymphoid P rogenitor |
| CMP | C ommon M yeloide P rogenitor |

| | |
|----------------|---|
| CSH | C ellule S ouche H ématopoïétique |
| CTNNA2 | CaTeNiN Alpha 2 |
| CUL1 | CULLIN 1 |
| D/ | |
| DCP1B | mRNA- DeCaP ing enzyme 1B |
| DLC1 | DLC1 Rho GTPase activating protein |
| DHAP | D examethasone, H igh-dose A ra- C -cytarabine P latinol (cisplatin) et cytarabine |
| DMP1 | D entin M atrix acidic phospho P rotein 1 |
| DNMTi | DNA M ethyl T ransferase i nhibitor |
| E/ | |
| EBF | E arly B cell F actor |
| EGF | E pidermal G rowth F actor |
| EIF2AK4 | E ukaryotic translation I nitiation F actor 2 A lfa K inase 4 |
| ELP | E arly L ymphoid P rogenitor |
| Era | E strogen receptor- α |
| ESX1 | ESX homeobox 1 |
| ETP | E arly T P rogenitor |
| ETS1 | ETS proto-oncogene 1 , transcription factor |
| E2A | T rans C ription F actor 3 (TCF3) |

F/

| | |
|---------------|---|
| FAT4 | FAT atypical cadherin 4 |
| FBXO25 | F-BoX protein 25 |
| FISH | Fluorescence In Situ Hybridization |

G/

| | |
|-----------------------------------|--|
| GM-CSFRα | Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor alpha chain |
| GRIP1 | Glutamate Receptor Interacting Protein 1 |

H/

| | |
|----------------------------|---|
| HAT | Histone AceTyltransferase |
| HAX1 | HCLS1 Associated protein X-1 |
| HDAC | Histone DéACétylase |
| HDACi | Histone DéACétylase inhibitor |
| HECT | Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus |
| HP1 | Hetereochromatin Protein 1 |
| H2AFX | H2A histone Family member X |
| H3K9me₃ | Triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 |
| H3K27me₃ | Triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 |
| H3K4me | méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 |
| H3K36me | méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 |
| HOX | HomeobOX |

I/

| | |
|--------------------------|---|
| iBET | inhibiteur of B romodomain and E xtra- T erminal proteins |
| Ig | I mmunoglobulin |
| IgH | I mmunoglobulin H eavy Chain |
| Igκ | I mmunoglobulin K appa Chain |
| Igλ | I mmunoglobulin L ambda Chain |
| IgL | I mmunoglobulin L ight Chain |
| IHH | I ndian H edge H og |
| IL | I nter L eukine |
| IL-7 | I nter L eukine 7 |
| IL-7R_α | I nter L eukine 7 receptor α |
| ITAM | I mmunoreceptor T yrosine-based A ctivation M otifs |

K/

| | |
|------------------|--|
| KLF2 | K ruppel L ike F actor 2 |
| Ku70/Ku80 | X -ray R epair C ross C omplementing 6/5 (X RCC6/ X RCC5) |

L/

| | |
|--------------|--|
| LEF-1 | L ymphoid E nhancer binding F actor 1 |
| LMPP | L ympho- M yeloïd P rogenitor |
| LTh | L ymphocyte T helper |
| LUZP4 | L e U cine Z ipper P rotein 4 |

M/

| | |
|----------------|--|
| MADS | M CM1, A GAMOUS, D EFICIENS, S RF |
| MALT | T issu L ymphoïde A ssocié aux M uqueuses |
| MAP3K14 | M itogen- A ctivated P rotein K inase K inase K inase 14 |
| MCL | M antle C ell L ymphoma |
| MED18 | M EDiateur 18 |
| MEF2 | M yocyte E nhancer F actor 2 |
| MEF2B | M yocyte E nhancer F actor 2B |
| MLL2 | K MT2D/ M yeloid/ L ymphoid or mixed-lineage L eukemia 2 |
| MLL3 | K MT2C/ M yeloid/ L ymphoid or mixed-lineage L eukemia 3 |
| MPP | M ulti P otent P rogenitor |
| mTOR | M ammalian T arget of R apamycin |
| MYD88 | M Yeloid D ifferentiation primary response 88 |
| MYOD1 | M YOgenic D ifferentiation 1 |

N/

| | |
|---------------|---|
| NEUROD | helix-loop-helix transcription factor NEURO genic D ifferentiation factor 1 |
| NFkB | N uclear F actor kB |
| NGS | N ext G eneration S equencing |
| NIK | alias MAP3K14 |
| NK | N atural K iller |
| NLS | N uclear L ocalization S ignal |
| NOTCH1 | N OTCH homolog 1 |

O/

OGDHL **O**xo**G**lutarate **D**e**H**ydrogenase-**L**ike

OMS **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté

OS **O**verall **S**urvivals

P/

PABC **P**oly**A**denylated **B**inding **P**rotein **C**

PAX5 B-cell-associated transcription factor **P**Aired bo**X** protein **5**

PEST **P**roline-**g**lutamic acid-**S**erine-**T**hreonine

PFS **P**rogression **F**ree **S**urvival

PI3K **P**hosphatidyl**I**nositol **3** **K**inase

PKC_β **P**rotéine **K**inase **C_β**

PLC_{γ2} **P**hospho**L**ipase **C_{γ2}**

POT1 **P**rotection **O**f **T**elomere **1**

PPAR_γ **P**eroxisome **P**roliferator-**A**ctivated **R**eceptor-**γ**

PTPRCAP **P**rotein **T**yrosine **P**hosphatase **R**eceptor type **C**-**A**ssociated **P**rotein

R/

RAD3 **A**TR checkpoint kinase **RAD3**

RAG **R**ecombinase **A**ctivating **G**enes

Rb **R**etinoblastome

RB1 **R**B transcriptional corepressor **1**

Région S **R**égion **S**witch

| | |
|----------------|--|
| RSS | R ecombination S ignal S equences |
| S/ | |
| SALL3 | SAL -Like transcription factor 3 |
| SCF | S tem C ell F actor |
| SDF-1 | S tromal cell- D erived F actor 1 |
| SET | Su (var)3-9, E nhancer-of-zeste and T rithorax |
| SF2 | S plicing F actor 2 |
| SF3B1 | S plicing F actor 3B subunit 1 |
| SLIT2 | SLIT guidance ligand 2 |
| SMARCA4 | SWI/SNF related M atrix associated, A ctin dependent R egulator of C hromatin, subfamily A , member 4 |
| SOX11 | SRY - box11 |
| SP140 | nuclear body protein |
| SRC | SaRC ome |
| SRC1 | SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase |
| SYK | S pleen associated tyrosine K inase |
| T/ | |
| TCF | |
| TdT | T erminal d éoxynucleotidyl T ransferase |
| TERT | T Elomerase R everse T ranscriptase |
| TET2 | TET methylcytosine dioxygenase 2 |

| | |
|----------------------|--|
| Th | lymphocytes T helper |
| TReg | lymphocytes T R egulateurs |
| TLR | T oll L ike R eceptor |
| TLR2 | T oll L ike R eceptor 2 |
| TNFAIP3 | T NF A lpha I nduced P rotein 3 |
| TP53 | T umor suppressor p53 |
| TP53BP1 | T umor suppressor p53 - B inding P rotein 1 |
| TRAF2 | T NF R eceptor A ssociated F actor 2 TRAF3 T NF R eceptor A ssociated F actor 3 |
| U/ | |
| UBA | U Biquitin A ssociated d omain |
| UBR | U Biquitin B inding R egion (d oigt de zinc) |
| UBR5 | U Bprotein ligase E3 component n- R5 |
| V/ | |
| V(D)J | V ariable D iversity J unction |
| V_H | V ariable domain from H eavy chain |
| V_L | V ariable domain from L ight chain |
| W/ | |
| WES | W hole E xome S equencing |
| WHSC1 | W olf- H irschhorn S yndrom C andidate 1 |
| WGS | W hole G enome S equencing |

Z/

ZNF117 **ZiNc Finger protein 117**

ZNF296 **ZiNc Finger protein 296**

ZNF784 **ZiNc Finger protein 784**

Chapitre 1- Physiologie des cellules B

1. Hématopoïèse-les principes généraux

L'hématopoïèse est un processus physiologique par lequel les cellules sanguines sont produites à partir d'un type cellulaire unique : les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) localisées dans la moelle osseuse et représentant moins de 1% de la totalité des cellules médullaires. Le concept de CSH a été formellement mis en évidence dans les années 1960 par les expériences de transplantations médullaires en série réalisées sur des modèles murins par Till et McCulloch (Till and Mc, 1961). Ces CSHs, qualifiées de multipotentes, sont capables non seulement de s'auto-renouveler indéfiniment mais aussi de se différencier sous l'action de facteurs de croissance et de facteurs de transcription afin de générer des progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes aboutissant, in fine, à la formation de cellules hématopoïétiques matures relarguées dans la circulation sanguine. Ces cellules hématopoïétiques matures constituent alors les trois lignées de cellules sanguines, à savoir : la lignée érythroïde : érythrocytes et plaquettes, la lignée lymphoïde : lymphocytes B, lymphocytes T, et lymphocytes NK (Natural Killer) et la lignée myéloïde : granulocytes (basophiles, neutrophiles, éosinophiles) et monocytes.

Ce processus de l'hématopoïèse est finement régulé par des mécanismes génétiques et épigénétiques modulant l'expression des gènes nécessaires au développement et à la différenciation des cellules sanguines. Des perturbations au niveau de ces réseaux de régulation étant fréquemment associées au développement tumoral, il est important de les caractériser pour mettre en évidence les acteurs moléculaires impliqués dans les pathologies hématologiques comme les hémopathies malignes.

2. Différenciation lymphoïde et myéloïde

L'hématopoïèse comporte plusieurs étapes successives impliquant la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques. Une étape très précoce de l'hématopoïèse est la différenciation des progéniteurs multipotents MPPs (multipotent progenitor) et LMPPs (lympho-myeloid progenitor) vers les progéniteurs des lignées érythroïde et myéloïde CMPs (common myeloid progenitor) ou vers les progéniteurs lymphoïdes CLPs (common lymphoid progenitor) et ETPs (early T progenitor). Les progéniteurs CLPs sont à l'origine des cellules B et NK produites dans la moelle, tandis que les progéniteurs ETPs migrent dans le thymus et forment la lignée T (Allman et al., 2003; Kondo et al., 1997).

Ce modèle de l'hématopoïèse montre que les CSHs font un choix précoce et définitif, s'engageant soit vers la lignée myéloïde soit vers la lignée lymphoïde. Toutefois, des données récentes montrent qu'il existe des modèles alternatifs de l'hématopoïèse dans lesquels des progéniteurs intermédiaires ont un potentiel aussi bien myéloïde que lymphoïde (Ceredig et al., 2009).

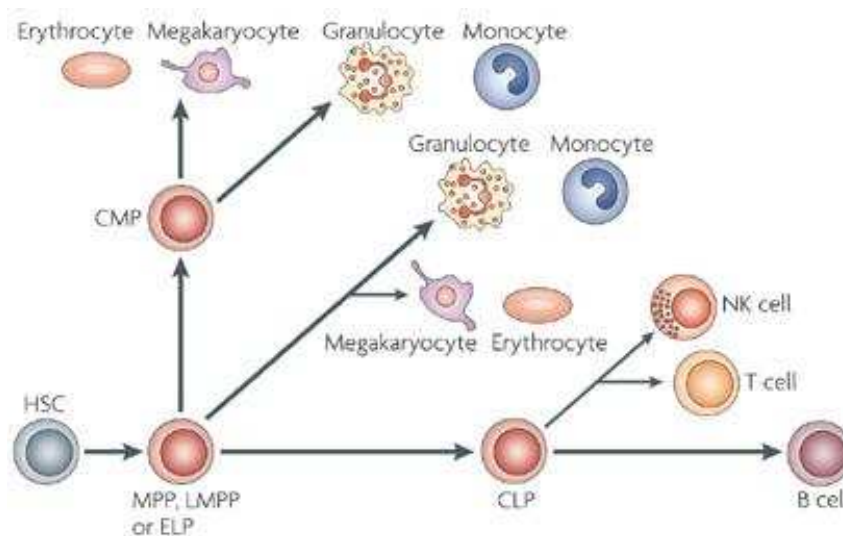


Figure 1. Modèle hiérarchique de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse adulte. Ce modèle représente des branches individuelles pour la différenciation myéloïde lymphoïde (Ceredig et al., 2009).

3. Ontogénie des lymphocytes B

Les lymphocytes sont reconnus comme des composants cellulaires majeurs du sang depuis longtemps mais leur rôle central dans l'immunité n'a été démontré qu'au milieu des années 1960 (Gowans, 1965). Ils sont divisés en trois catégories : les lymphocytes T, les lymphocytes NK et les lymphocytes B.

Les lymphocytes B (dérivé du mot bursal en anglais ou bourse de Fabricius, organe lymphoïde primaire chez les oiseaux) représentent environ 5 à 15% des lymphocytes circulants et interviennent dans l'immunité humorale grâce aux anticorps qu'ils produisent et qui serviront à la reconnaissance spécifique et à la destruction d'agents pathogènes dans l'organisme.

Il existe quatre catégories de lymphocytes B : les plasmocytes, les lymphocytes B naïfs, les lymphocytes B mémoires et les lymphocytes B régulateurs. Les plasmocytes sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale, produisant et sécrétant les anticorps. Les lymphocytes B naïfs sont matures et immunocompétents mais n'ont encore jamais rencontré d'antigènes. Les lymphocytes B mémoires, quant à eux, sont capables de persister à l'état quiescent sans proliférer et ont la capacité de présenter très rapidement et efficacement l'antigène aux lymphocytes T lors d'une réponse immunitaire secondaire mais également de se différencier en plasmocytes. Enfin, les lymphocytes B régulateurs sont impliqués dans l'homéostasie B via leur production d'interleukine IL-10.

Il existe deux phases dans le développement des lymphocytes B : la lymphopoïèse B et l'immunopoïèse B. D'une part, la lymphopoïèse B permet la production de lymphocytes B immunocompétents et « naïfs » dans la moelle osseuse ; autrement dit, capables de reconnaître un antigène, via un récepteur fonctionnel, sans en avoir encore jamais rencontré. D'autre part, l'immunopoïèse B permet de produire des lymphocytes B effecteurs ou mémoires en présence d'antigènes dans les organes lymphoïdes secondaires.

3.1 Lymphopoïèse B médullaire : phase antigène indépendante

a) Mécanismes généraux

i. Réarrangements des gènes d'immunoglobulines

La différenciation des CSHs en lymphocytes B matures est marquée par des phases successives de réarrangements génétiques somatiques des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (Ig) présentes à la surface des lymphocytes B matures. Ce processus s'effectue par un mécanisme de recombinaisons de segments d'ADN V(D)J (Variable, Diversité et Jonction) et permet l'expression d'un récepteur membranaire fonctionnel, appelé le BCR (B cell receptor), à la surface de ces lymphocytes B.

Chez l'Homme, les gènes codant pour les immunoglobulines sont situés sur le chromosome 14 (14q32) pour le locus des chaînes lourdes (IgH), sur le chromosome 2 (2p12) pour le locus des chaînes légères kappa (Igκ) et sur le chromosome 22 (22q11) pour le locus des chaînes légères lambda (Igλ). Ces gènes d'immunoglobulines sont morcelés ; autrement dit, ils sont organisés en segments (configuration dite germinale). En effet, les gènes codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) sont constitués des segments géniques V, D et J tandis que les gènes codant pour les chaînes légères des immunoglobulines (IgL) sont composés uniquement des segments V et J. Les réarrangements IgH surviennent en premier. Une première recombinaison assemble les segments D_H et J_H au stade précoce de la cellule pro-B puis une seconde recombinaison s'effectue entre le segment recombiné D_HJ_H et le segment V_H au stade tardif des cellules pro-B. Les réarrangements des chaînes légères des immunoglobulines (IgL), quant à eux, ont lieu plus tardivement, à la fin du stade pré-B, en une seule recombinaison survenant entre le segment V_L et le segment J_L (**Figure 2**).

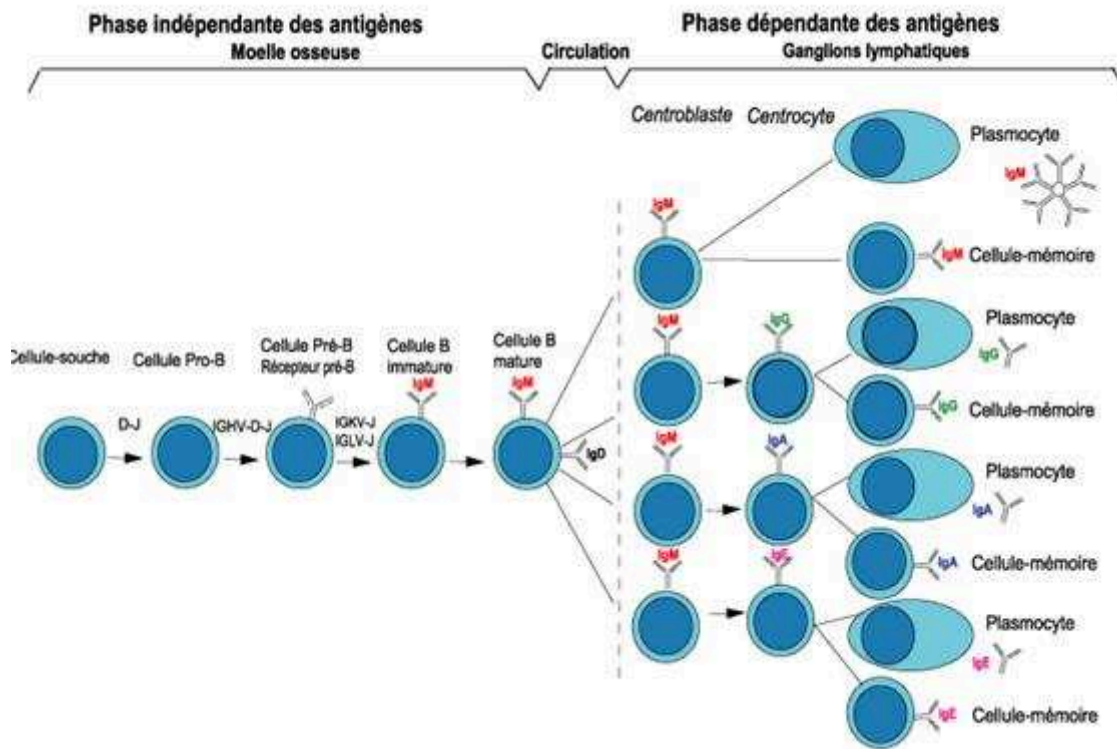


Figure 2. Différenciation des lymphocytes B. D'après Lefranc M.-P. et Lefranc G., IMGT, the international ImMunoGeneRics information system, <http://imgt.cines.fr/>, Montpellier, France.

Cette recombinaison des segments V, D et J est dirigée par des séquences appelées RSS (Recombination Signal Sequences) adjacentes à chacun de ces segments. Ces séquences RSS sont constituées de deux motifs conservés : un nonamère (séquence consensus 5'-ACAAAAACC) et d'un heptamère (séquence consensus 5'-CACAGTG) séparés tous deux par une séquence intermédiaire non conservée de 12 ou 23 nucléotides. La longueur de cette séquence intermédiaire définit alors les deux types de RSS : 12 RSS et 23 RSS (Sakano et al., 1979). La recombinaison a lieu uniquement entre les segments ayant des séquences RSS contenant des séquences intermédiaires différentes de 12 ou 23 nucléotides (règle 12/23) (Tonegawa, 1983) et nécessite la coupure de deux séquences RSS pour former une jonction fonctionnelle entre ces deux segments. La présence de l'heptamère au sein des séquences RSS favorise la liaison des recombinases RAG (Recombinase Activating Genes) sur ces RSS, déterminant ainsi le site de clivage. En effet, les recombinases RAG-1 et RAG-2, par leur fonction d'endonucléases, clivent l'ADN au niveau de ces séquences RSS, permettant alors l'ouverture du brin d'ADN puis la formation et l'ouverture d'une structure d'ADN en « épingle à cheveux » par le complexe protéique Ku70/Ku80 (X-ray repair cross complementing 6/5) et de l'endonucléase Artemis.

De façon aléatoire, plusieurs nucléotides sont ensuite ôtés et remplacés par d'autres via une exonucléase et la protéine TdT (Terminal désoxynucleotidyl Transferase) au niveau du site de coupure. Ce mécanisme de suppression/ajout de nucléotides aléatoire permet de générer des jonctions de plusieurs combinaisons possibles, favorisant également ainsi la diversité du répertoire B. Enfin, une étape de ligation finale se produit entre les segments géniques via l'ADN ligase IV.

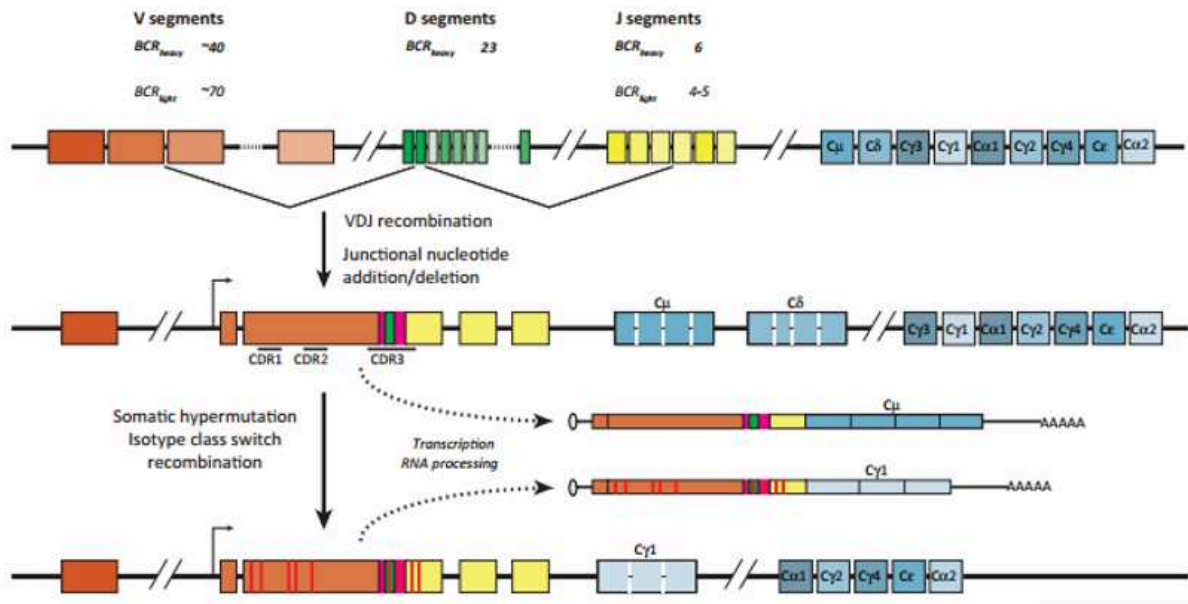


Figure 3. Mécanisme de réarrangements V(D)J. Le récepteur BCR est composé de deux chaînes distinctes : la chaîne légère et la chaîne lourde. Le site de liaison de l'antigène est formé d'une région variable pour chaque chaîne, codé par les segments V, D et J. La diversité du répertoire du récepteur à l'antigène est établie durant le développement lymphocytaire, au cours du réarrangement des segments V (orange), D (vert) et J (jaune). Durant le processus de recombinaison, des nucléotides sont ajoutés ou supprimés au niveau des jonctions des segments (fuchsia). La diversification secondaire spécifique du BCR se produit après la reconnaissance de l'antigène. Au cours du processus d'hypermutations somatiques, des mutations (rouges) sont introduites dans la région variable. Au cours de la recombinaison dite de commutation de classe (class-switch), les segments géniques codant les régions constantes (bleu) sont réarrangés, ce qui conduit à la production d'anticorps avec différents isotypes correspondant à des fonctions effectrices différentes.

Le grand nombre de segments V, D et J et les multiples combinaisons possibles entre eux (diversité combinatoire) ainsi que les multiples mécanismes de jonction (diversité jonctionnelle) assurent la grande diversité du répertoire B chez l'Homme (10^9 à 10^{13}).

lymphocytes B différents). Cette diversité est indispensable à la reconnaissance spécifique de la grande variété des peptides antigéniques (**Figure 3**).

ii. Caractéristiques structurales du récepteur aux cellules B

Les récepteur des cellules B (BCR) sont des récepteurs membranaires caractéristiques des lymphocytes B, qui leur procurent la propriété de reconnaître des peptides antigéniques présents à la surface de l'agent pathogène. Le BCR est un hétéro-tétramère constitué de deux chaînes lourdes H (Heavy) identiques entre elles et de deux chaînes légères L (Light) également toutes deux identiques, reliées entre elles de façon covalente par des ponts disulfures. Les chaînes lourdes sont constituées de deux régions : une région variable V_H (Variable domain from Heavy chain) et une région constante C_H (Constant domain from Heavy chain) décomposée en trois sous-régions : C_{H1} , C_{H2} et C_{H3} . Les chaînes légères sont constituées de deux régions : une région variable V_L (Variable domain from Light chain) et une région constante C_L (Constant domain from Light chain). L'association des parties variables des chaînes lourdes et légères définit le paratope capable de reconnaître un épitope présent sur un antigène via des régions CDR (Complementary Determining Region) contenues dans les parties variables des chaînes lourdes et légères (**Figure 4**).

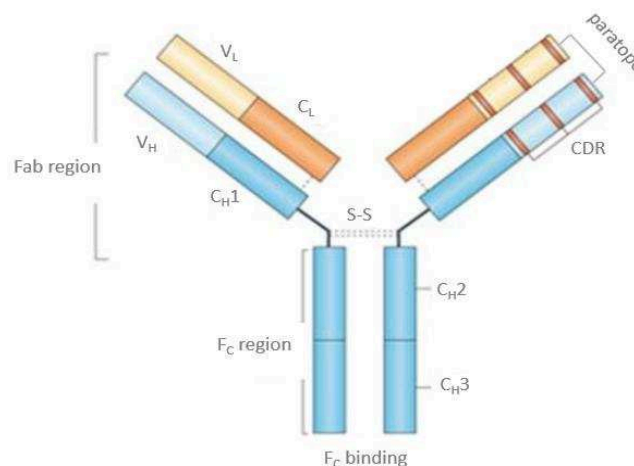


Figure 4. Représentation schématique du récepteur des cellules B (BCR). Chaîne lourde (Heavy Chain) (bleu) ; C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} : parties constantes de la chaîne lourde. V_H : partie variable de la chaîne lourde. Chaîne légère (Light Chain) (orange) ; C_L : partie constante de la chaîne légère. V_L : partie variable de la chaîne légère. CDR : (Complementary Determining Region) (rouge).

Le BCR ne peut à lui seul transmettre un signal car sa région intra-cytoplasmique est de trop petite taille. Pour cette raison, le BCR est toujours associé de façon non-covalente à des molécules de transduction du signal telles que CD79A (Ig α) et CD79B (Ig β). En effet, CD79A et CD79B constituent un hétérodimère associé à la chaîne lourde de l'immunoglobuline formant, avec la chaîne légère, un BCR fonctionnel, et capable d'être activé suite à la reconnaissance d'un antigène. Cette activation du BCR engendre la phosphorylation de tyrosines très conservées (les tyrosines ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) : Tyr188 et Tyr199) au niveau des domaines cytoplasmiques de CD79A et CD79B par des kinases de la famille SRC (sarcome) et plus précisément SYK (spleen tyrosine kinase). Cette phosphorylation engendre la transduction du signal par CD79A et de ce fait, l'initiation de la signalisation du BCR qui contribue à l'activation de ces lymphocytes B (Kurosaki et al., 1994).

b) Contrôle transcriptionnel de la lymphopoïèse B

La compréhension du processus régulant la différenciation des CSHs en une cellule B mature a considérablement augmenté ces dernières années. Ces étapes de différenciation et maturation des lymphocytes B sont régulées par de nombreuses cytokines telles que IL-7 (Interleukine 7), SCF (Stem cell factor) et SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) ainsi que de nombreux facteurs de transcription. Parmi eux, on note les facteurs de transcription qui sont particulièrement importants dans l'engagement dans la lignée B, régulant les stades précoces du développement des lymphocytes B jusqu'au stade pro-B, comme Ikaros, PU.1 (Spi-1), E2A (transcription factor 3), EBF (early B cell factor) et PAX5 (B-cell-associated transcription factor paired box protein 5), (LeBien and Tedder, 2008; Nutt and Kee, 2007) (**Figure 5**).

D'autres facteurs de transcription interviennent plus tardivement dans la différenciation de la lignée B, à la fin du stade pro-B jusqu'au stade pré-B. Il s'agit entre autres de LEF-1 (lymphoid enhancer binding Factor 1) et MEF2 (myocyte enhancer factor 2).

i. IKAROS

Les protéines IKAROS (Georgopoulos, 2002), HELIOS (Kelley et al., 1998) et AIOLOS (Morgan et al., 1997) constituent une famille de facteurs de transcription à doigts de Zinc impliqués dans le devenir des cellules hématopoïétiques. Ces facteurs de transcription

forment des homo- ou des hétérodimères via deux domaines en doigt de zinc dans leur partie C-terminale et comportent un domaine de liaison de l'ADN au niveau de leur partie N-terminale.

D'un point de vue moléculaire, IKAROS n'agit pas comme un facteur de transcription conventionnel. En effet, au lieu de réguler la transcription de gènes cibles lui-même, IKAROS fonctionne comme un régulateur épigénétique en modulant la structure de la chromatine voisine de ces gènes, affectant ainsi leur transcription (Kim et al., 1999). IKAROS appartient, en effet, à deux complexes protéiques capables de remodeler la chromatine : Il s'agit, d'une part, du complexe IKAROS-NuRD (le plus abondant) contenant 10 à 12 protéines IKAROS liées ensemble avec deux histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 et une ATPase Mi-2 β et recruté au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique des lymphocytes activés où il a une activité déacétylase des histones (Kim et al., 1999); et d'autre part, du complexe IKAROS-SWI/SNF (le moins abondant), également impliqué dans un rôle de déacétylation des histones mais plutôt dans les régions dépourvues d'hétérochromatine (Koipally et al., 1999).

Le gène IKAROS est requis pour le développement de la lignée lymphoïde (Georgopoulos et al., 1994). En effet, Ikaros est impliqué dans le développement des lymphocytes B (transition du stade pro-B au stade pré-B) et plus tardivement dans le contrôle de leur maturation, leur prolifération et dans la formation des centres germinatifs des ganglions lymphatiques (Kirstetter et al., 2002) mais aussi dans la différenciation des cellules dendritiques murines (Wu et al., 1997). De plus, la protéine IKAROS joue un rôle dans le développement des lymphocytes T et NK humains (Wang et al., 1996) (**Figure 5**).

ii. PU.1

Chez l'Homme, le gène SPI1 code pour la protéine PU.1, un membre de la famille des facteurs de transcription Ets, capable de se lier à une séquence riche en purine (PU-Box) située proche des promoteurs des gènes cibles de PU.1, régulant ainsi leur expression. La protéine PU.1 agit en parallèle d'IKAROS dans la régulation du développement de la lignée lymphoïde. Le gène SPI1, exprimé dans les CSHs, les progéniteurs multipotents et dans toutes les cellules sanguines matures à l'exception des érythroblastes, des mégacaryocytes et des lymphocytes T (Hromas et al., 1993), semble d'ailleurs être impliqué dans l'engagement vers

la lignée myéloïde versus lymphoïde. En effet, un haut niveau d'expression de PU.1 induit la différenciation des CSHs vers les progéniteurs myéloïdes alors qu'un faible niveau d'expression de PU.1 engendre leur différenciation vers les progéniteurs lymphoïdes (DeKoter and Singh, 2000). PU.1 agit donc précocement dans le développement lymphocytaire en activant directement des gènes cibles comme *IL-7R α* (Interleukin-7 receptor alpha) ou encore *GM-CSFR α* (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor alpha chain) par exemple (DeKoter et al., 2002) (**Figure 5**).

iii. E2A et EBF

Le facteur de transcription E2A appartient à la famille des protéines E (protéines à hélice-boucle-hélice basique) avec les facteurs HEB et E2-2. E2A est constitué de deux domaines de transactivation (AD1 et LH) et d'une région hélice-boucle-hélice basique impliquée dans la liaison à l'ADN.

Le facteur de transcription EBF, quant à lui, comporte un domaine de transactivation et se lie à l'ADN via son domaine N-terminal en doigt de Zinc (Hagman et al., 1995). Contrairement à E2A qui n'est exprimé qu'au niveau des cellules pro-B, EBF est exprimé non seulement dans ces cellules pro-B mais aussi dans les cellules pré-B et B matures. Néanmoins, E2A et EBF agissent en synergie (E2A agissant en amont) dans le contrôle du développement des cellules pro-B en induisant la transcription de gènes cibles comme $\lambda 5$ et VpreB (impliqués dans les réarrangements de la chaîne légère d'immunoglobuline) mais aussi Ig α et Ig β (composants du pré-BCR) (Greenbaum and Zhuang, 2002). D'ailleurs, le développement des cellules pro-B est caractérisé par des réarrangements successifs des segments D et J suivi par une recombinaison des segments V-D-J des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) contrôlés par E2A et EBF en régulant l'expression des enzymes RAG1 (recombination activating 1) et RAG2 (recombination activating 2) impliquées dans ces mécanismes (Bain et al., 1994) (**Figure 5**).

iv. PAX5

L'activation des gènes spécifiques de la lignée lymphoïde B ainsi que les recombinaisons des segments V(D)J des chaînes d'immunoglobulines par E2A et EBF ne sont

pas suffisantes pour engager les progéniteurs CLP dans le développement des cellules B jusqu'au stade pro-B. En effet, un autre facteur de transcription exprimé au sein des cellules pro-B jusqu'au stade des cellules B matures, appelé PAX5 (B-cell-associated transcription factor paired box protein 5), est également nécessaire. Le gène PAX5 est un membre de la famille des facteurs de transcription à paired box (PAX) capables de lier directement l'ADN. PAX5 se lie au niveau des séquences promotrices au niveau des loci d'immunoglobulines et il est sans doute le facteur de transcription le plus important pour le développement des lymphocytes B. En effet, PAX5 régule l'expression d'au moins 170 gènes dont la majorité ont un rôle crucial non seulement dans la signalisation des cellules B mais aussi dans l'adhésion et la migration des cellules B matures (Cobaleda et al., 2007) (**Figure 5**).

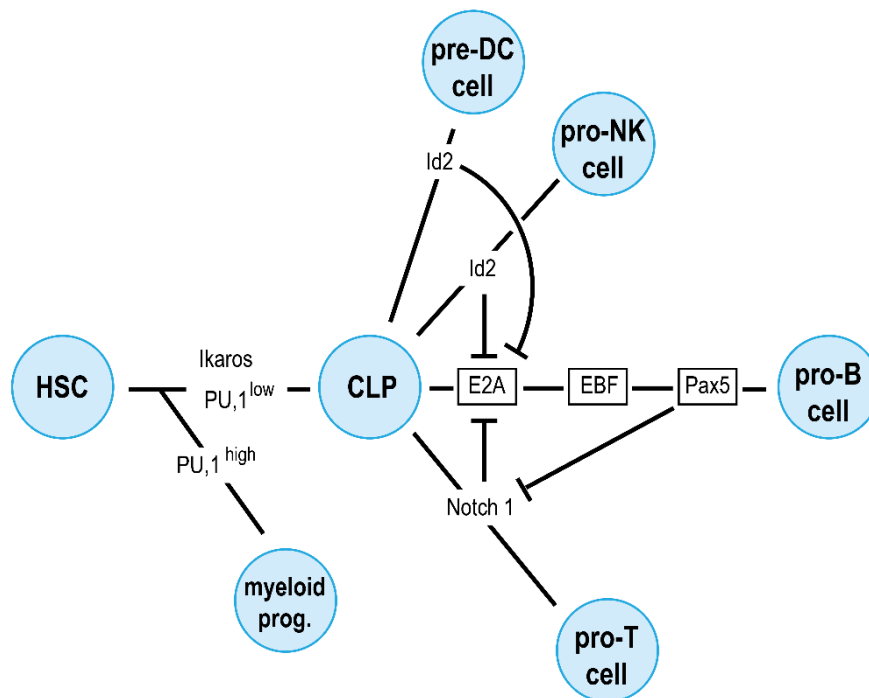


Figure 5. Contrôle transcriptionnel de la différenciation des lymphocytes B (Busslinger, 2004).

v. LEF1

LEF1 est un membre de la famille des facteurs de transcription TCF (T-cell factor)/LEF (lymphoid enhancer binding factor), jouant un rôle important dans la régulation de la voie de signalisation Wnt de gènes cibles (Behrens et al., 1996). LEF1 est

particulièrement exprimé à la fin du stade pro-B et au niveau du stade pré-B de la différenciation des lymphocytes B et il est essentiel pour leur survie et leur prolifération. Une étude a en effet démontré, *in vitro* et *in vivo*, des anomalies de la prolifération et la survie des cellules pro-B chez des souris Lef1 *-/-* dues à une augmentation du niveau de transcription du proto-oncogene c-myc (Reya et al., 2000).

vi. MEF2

Les facteurs de transcription MEF2 appartiennent à la famille des MADS-box qui codent pour un domaine de liaison à l'ADN appelé MADS. Cet acronyme doit son nom aux quatre premiers membres dans lesquels ce domaine a été identifié, à savoir : MCM1 (*Saccharomyces cerevisiae*), AGAMOUS (*Arabidopsis thaliana*), DEFICIENS (*Antirrhinum majus*) et SRF (*Homo sapiens*). Ce domaine MADS se lie à des séquences d'ADN proches du motif CC[A/T]₆GG (West et al., 1997). Ces facteurs ont été décrits pour leurs rôles essentiels dans le développement neuronal et musculaire mais également pour leur forte réponse aux voies de signalisation extracellulaires (Potthoff and Olson, 2007). Chez les vertébrés, il existe quatre paralogues : MEF2A, MEF2B, MEF2C et MEF2D. MEF2C, notamment, a été décrit comme un régulateur de l'homéostasie des cellules B (Gekas et al., 2009) et de l'activation antigénique ((Wilker et al., 2008). De plus, MEF2C et MEF2D sont activés par les récepteurs des cellules pré-B et ont été décrits comme étant essentiels à la transition pré-B (Herglotz et al., 2016).

Ces exemples de facteurs de transcription illustrent bien la complexité du contrôle transcriptionnel survenant à travers les différentes étapes de la différenciation des cellules B. Il est d'ailleurs désormais admis que des perturbations au sein de ces facteurs de transcription peuvent avoir d'importantes conséquences. Par exemple, il a été montré le rôle crucial de LEF1 dans de nombreux cancers solides comme certains types de cancers du sein pour lesquels la surexpression d'ErbB2 (he-2/neu) est absente (Nguyen et al., 2005). De plus, la surexpression de LEF1 a été démontrée dans la leucémie lymphoïde chronique (Jelinek et al., 2003). Enfin, des délétions MEF2C ainsi que des translocations chromosomiques impliquant le gène MEF2D, décrites dans la leucémie aigüe lymphoblastique ont été reportées.

3.2 Immunopoïèse dans les organes lymphoïdes secondaires : phase antigène dépendante

a) Architecture histologique des organes lymphoïdes secondaires

Au sein du tissu lymphoïde, on distingue les organes lymphoïdes primaires (thymus et moelle osseuse) qui sont le siège de la différenciation des lymphocytes T et B produits à partir des CSHs, des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT)).

Ces organes lymphoïdes secondaires possèdent des caractéristiques structurales communes telles que la zone B, par exemple. Cette zone B est composée de follicules (nodules) lymphoïdes constitués de lymphocytes. On distingue deux types de follicules lymphoïdes : les follicules lymphoïdes primaires et les follicules lymphoïdes secondaires. Après contact avec un antigène, les follicules primaires se transforment en follicules secondaires comportant un centre germinatif composés de trois types cellulaires : les centroblastes, les centrocytes et les cellules dendritiques folliculaires. Les centroblastes font l'objet d'une intense prolifération accompagnée de mutations somatiques des segments géniques codant les domaines VH et VL, provoquant des modifications du BCR et de son affinité pour l'antigène. Les centroblastes se différencient ensuite en centrocytes qui expriment ce BCR muté. Ces centrocytes sont exposés à l'antigène présenté à la surface des cellules dendritiques folliculaires. Cette interaction BCR/antigène induit un signal de survie et de différenciation en cellules B mémoires qui gagnent la circulation lymphatique ou en plasmocytes, qui rejoignent, pour la plupart, la moelle osseuse (**Figure 2**).

b) Hypermutation somatique et commutation de classe

Après le processus de réarrangement des gènes codant pour les chaînes immunoglobulines, les lymphocytes B, encore immatures, doivent poursuivre leur différenciation afin de devenir des lymphocytes B matures exprimant à leur surface des IgM et des IgD. Suite à l'activation du BCR par liaison à un antigène, un signal active d'autres mécanismes responsables de l'augmentation de la diversité des immunoglobulines, indispensable à la spécificité vis-à-vis de l'antigène ; il s'agit d'une part, de l'hypermutation

somatique et d'autre part, de la commutation de classe ayant lieu, toutes deux au niveau des centres germinatifs des follicules secondaires présents au sein des ganglions lymphatiques.

L'hypermutation somatique est un processus par lequel des mutations somatiques ponctuelles sont introduites par l'intermédiaire de l'enzyme AID (activation induced cytidine deaminase) au sein des segments variables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines suite à l'activation du BCR par liaison à un antigène. Le but de ce processus est de générer des lymphocytes B qui auront une meilleure affinité pour l'antigène afin d'obtenir des anticorps plus efficaces et des cellules mémoires plus spécifiques lors d'une deuxième infection. Cette enzyme AID semble jouer d'ailleurs un rôle intéressant puisque des données récentes suggèrent qu'elle pourrait intervenir dans la déméthylation importante qui survient dans le centre germinatif (Dominguez et al., Cell, 2015).

La commutation de classe, quant à elle, est un processus permettant d'exprimer une immunoglobuline d'un autre isotype. Il existe ainsi cinq classes d'immunoglobulines (IgM, IgD, IgG, IgE et IgA) capables de reconnaître le même antigène (car seules les régions constantes diffèrent entre les divers isotypes) mais ayant des rôles différents au sein de l'organisme. L'IgM étant le premier isotype exprimé à la surface des lymphocytes B. Ce mécanisme correspond à un réarrangement irréversible de l'ADN par excision des séquences d'ADN situées entre le segment J de l'IgM et le gène codant pour la partie constante de la chaîne lourde de l'immunoglobuline de l'isotype voulu. Ceci est possible par la présence de régions S (Switch) impliquées dans l'excision de toutes les séquences d'ADN situées entre ces deux régions S (**Figure 6**).

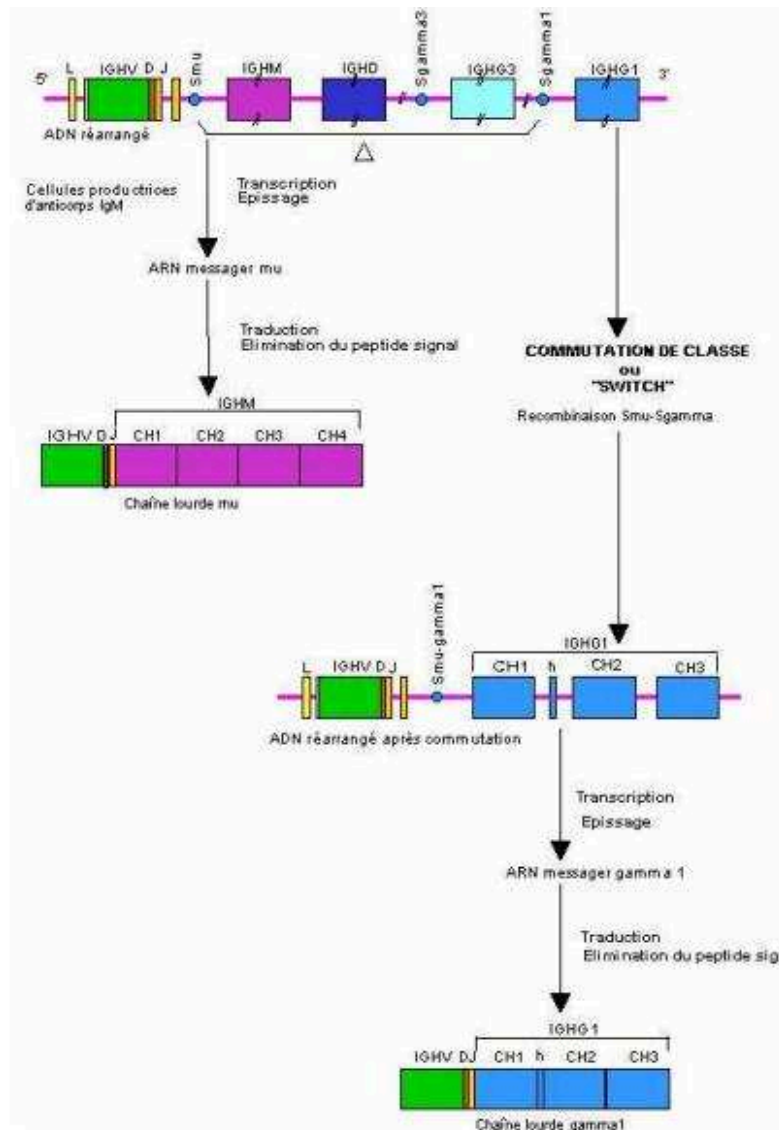


Figure 6. Mécanisme de commutation de classe. La commutation de classe représentée ici a lieu entre une IgM et une Ig gamma1. Les régions S (Switch) Smu et Sgamma1 sont situées respectivement avant le gène codant pour la partie constante de la chaîne lourde de l'IgM (IGHM) (fuchsia) et avant le gène codant pour la partie constante de la chaîne lourde de l'Ig gamma1 (IGHG1) (bleu clair). Ces séquences Smu et Sgamma1 permettent l'excision des séquences d'ADN situées entre elles par mécanisme d'épissage générant ainsi un ARN messager spécifique gamma1 qui sera ensuite traduit. La séquence Smu-gamma1 est éliminée à la fin du mécanisme. *D'après un cours de la faculté de Lyon-Inserm.*

Chapitre 2- Lymphome à cellules du manteau

1. Caractéristiques cliniques

1.1 Classification et origine cellulaire

Le lymphome à cellules du manteau est décrit comme une hémopathie lymphoïde à cellules B matures selon la nouvelle classification des hémopathies malignes publiée en 2016 par l'organisation mondiale de la santé (OMS) basée sur des critères hématologiques, cliniques, cytologiques, immunophénotypiques et génétiques (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

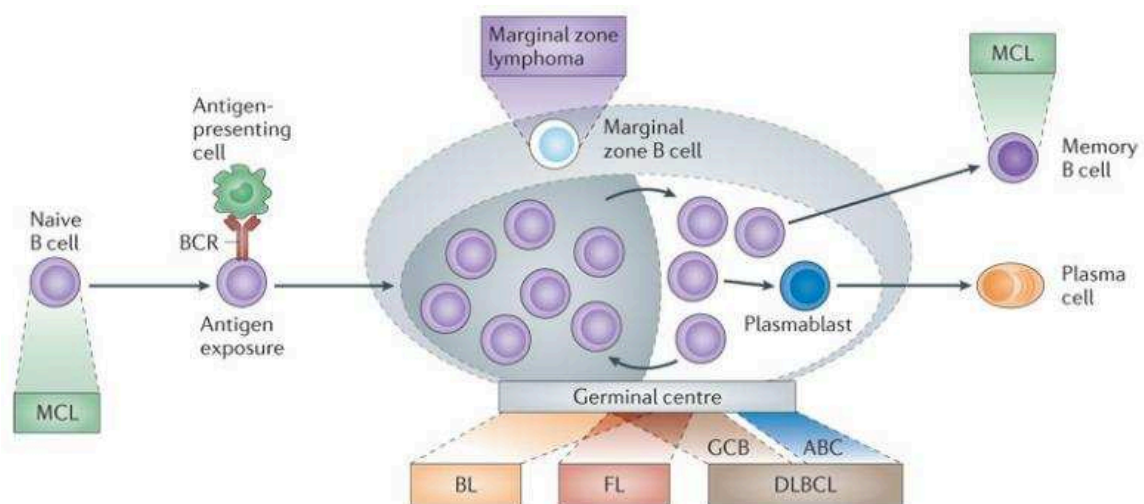


Figure 7. Origine cellulaire du lymphome à cellules du manteau. Représentation schématisée d'un ganglion lymphatique composé de trois zones : le centre germinatif, la zone du manteau et la zone marginale (Scott and Gascoyne, 2014).

Le lymphome à cellules du manteau est, en effet, un lymphome dérivé des cellules B matures représentant environ 5% des lymphomes non-Hodgkiniens. Histologiquement, le lymphome à cellules du manteau est dû à une prolifération anormale des lymphocytes B

matures, présents physiologiquement au niveau de la zone du manteau qui entoure le centre germinatif des follicules lymphoïdes au sein des ganglions lymphatiques (**Figure 7**)

1.2 Manifestations cliniques

Le lymphome à cellules du manteau survient principalement chez les patients âgés (âge médian : 68 ans) et de façon prédominante chez les patients de sexe masculin (rapport M/F: 4:1). En France, la prévalence est estimée à 1 individu sur 25 000 et l'incidence est de 3 cas pour 100 000 individus par an.

Bien que le pronostic des patients nouvellement diagnostiqués soit devenu moins défavorable au cours des dernières décennies, ce cancer hématologique est agressif et très difficilement curable avec une médiane de survie globale estimée entre 4 et 5 ans (Herrmann et al., 2009). En effet, au moment du diagnostic, la majorité des patients présentent déjà des stades avancés de la maladie tels que les stades III ou IV selon la classification d'Ann Arbor. Cette pathologie est d'ailleurs souvent associée à des adénopathies généralisées (90% des cas) mais elle est également présente au niveau de sites extra ganglionnaires comme le tractus gastrointestinal (60% des cas) ou encore sous forme d'atteintes médullaires (55-80% des cas) (Campo et al., 2011). L'apparition de fièvre, sueurs nocturnes et l'altération de l'état général (fatigue, perte de l'appétit, perte de poids) sont les symptômes les plus courants (Wang and Ma, 2014).

1.3 Diagnostic

Biologiquement, le lymphome à cellules du manteau est une pathologie très hétérogène. Son diagnostic nécessite donc une approche multidisciplinaire alliant des études anatomopathologiques, cytologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire.

a) Immunophénotypage par cytométrie de flux

L'immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux est la méthode de référence pour la classification et le diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs à partir de lymphocytes recueillis dans le sang ou la moelle osseuse. En effet, il permet de

déterminer la nature des cellules B. Techniquement, des anticorps, dirigés contre des antigènes de surface, appelés CD (Cluster de Différenciation), spécifiques d'un type de lymphocyte donné, sont couplés à des fluorochromes.

Le lymphome à cellules du manteau est caractérisé par un immunophénotypage bien particulier : CD19⁺, CD20⁺, CD5⁺, CD23⁻ et CD10⁻. Les marqueurs CD19 et CD20, du fait qu'ils soient tous deux exprimés à la surface des lymphocytes B, permettent de distinguer les pathologies lymphoïdes B des pathologies lymphoïdes T. En effet, le CD19 appartient à la superfamille des immunoglobulines et joue un rôle clé en tant que régulateur dans le développement, l'activation et la différenciation des lymphocytes B. De même, le CD20, une phosphoprotéine non glycosylée, est également impliquée dans ces étapes d'activation et de différenciation.

Le marqueur CD5 est, quant à lui, plutôt un marqueur des lymphocytes T; sa présence à la surface des lymphocytes B situés dans la zone du manteau est donc caractéristique du lymphome à cellules du manteau et joue un rôle de régulateur négatif de la signalisation issue du BCR. Toutefois, il est intéressant de noter que le CD5 est absent dans certains cas rares de lymphome à cellules du manteau. Le CD5 n'est donc pas l'unique marqueur de cette maladie et seul un immunophénotypage complet peut permettre d'établir le diagnostic.

En outre, le marqueur CD23 (récepteur de l'IgE de basse affinité) permet la distinction entre la leucémie lymphoïde chronique (LLC) où il est présent et le lymphome à cellules du manteau pour lequel il est absent.

Enfin, le marqueur CD10 (néprilysine) est une métallo-endoréptidase identifiée à la surface des cellules progénitrices lymphoïdes précoces des cellules B immatures de la moelle osseuse ainsi que des lymphocytes B des centres germinatifs. De ce fait, le CD10 est un marqueur retrouvé dans la leucémie lymphoblastique aigüe, le lymphome lymphoblastique, le lymphome folliculaire et le lymphome de Burkitt plutôt que dans le lymphome à cellules du manteau.

b) Aspects anatomo-pathologiques

Histologiquement, il existe trois formes « architecturales » différentes de lymphome à cellules du manteau qui pourraient représenter différents stades d'évolution de la maladie. Il s'agit de la forme classique qui représente 80 à 90% des cas, la forme pléomorphe

représentant 6% des cas et de la forme blastoïde qui correspond à environ 3% des cas. Ces deux dernières formes sont considérées comme les plus agressives.

Dans le lymphome à cellules du manteau dit de forme classique, les cellules tumorales sont d'aspect monomorphe, de taille moyenne et pourvues de noyaux aux contours irréguliers et à la chromatine fine. Trois formes histologiques sont décrites : La forme dite « in situ » comporte des cellules tumorales organisées en fine couronne autour du centre germinatif des follicules lymphoïdes réactionnels. Dans la forme nodulaire, les cellules tumorales colonisent et infiltrent le centre germinatif. La forme diffuse, quant à elle, efface totalement l'architecture ganglionnaire.

Dans la forme blastoïde, les cellules tumorales ressemblent à des lymphoblastes avec des noyaux à chromatine fine d'index mitotique élevé. La forme pléomorphe, quant à elle, possède des cellules tumorales, qui par définition, sont plus hétérogènes et souvent de grande taille (**Figure 8**).

Dans les dernières années, il a été décrit un sous-groupe de patients atteints de lymphome à cellules du manteau de forme cliniquement plus indolente avec une survie plus longue (souvent plus de 7 à 10 ans). L'absence de l'expression du facteur SOX11 (C Myc-related HMG box proteins), impliqué, entre autre, dans le contrôle de la différenciation cellulaire pendant le développement et la faible expression du marqueur de prolifération Ki-67 pourraient donc jouer un rôle dans l'identification de ces formes moins agressives. De plus, 70% de ces formes indolentes ont un fort taux de gènes IGVH mutés (>5%) (Fernandez et al, Cancer Res, 2010).

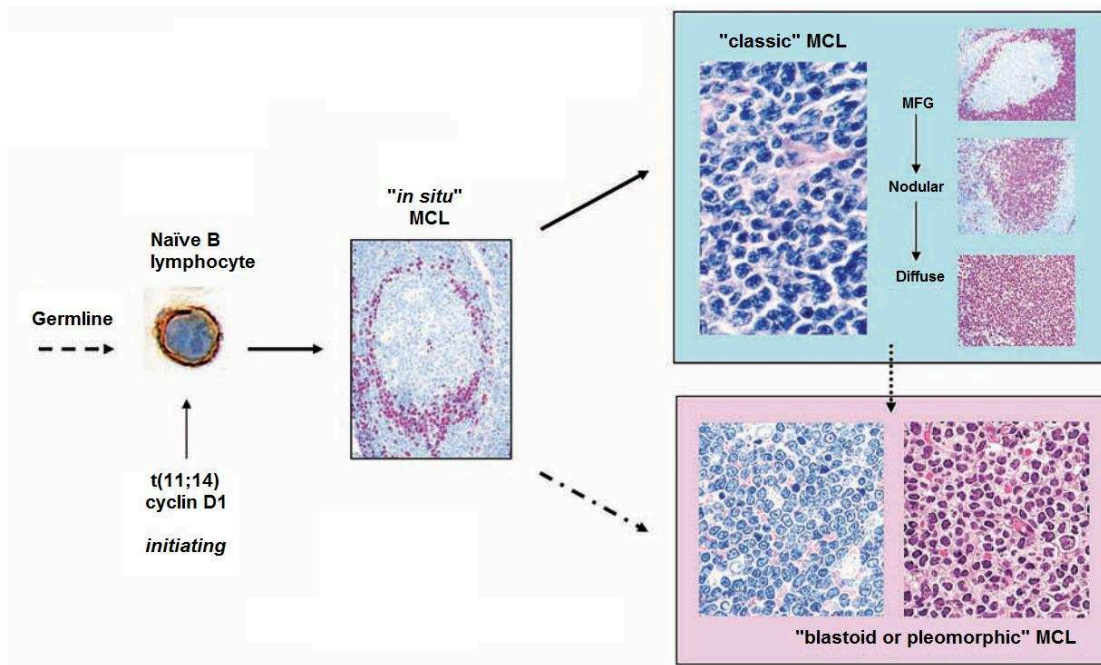


Figure 8. Représentation schématique des différentes formes histologiques du lymphome à cellules du manteau. La forme « in situ » (panel de gauche), la forme classique (panel du haut), la forme blastoïde (panel en bas à gauche) et la forme pléomorphe (panel en bas à droite) du lymphome à cellules du manteau sont représentées. La forme classique et blastoïde sont colorées au Giemsa contenant de l'azur de méthylène (basique) qui colore les noyaux en se fixant sur les acides nucléiques et de l'éosine (acide) colorant les cytoplasmes (basiques). La forme pléomorphe est marquée avec de l'hématoxyline (basique) qui colore les noyaux et de l'éosine (acide) colorant les cytoplasmes (basiques). Le marquage immunohistochimique anti phosphatase alcaline (fuchsia) correspond au marquage anti-cycline D1 (formes « in situ » et nodulaire et diffuse) *adapté d'après* (Pileri and Falini, 2009).

2. Des thérapies variées : du traitement conventionnel aux nouvelles thérapies ciblées

2.1 Traitements de première ligne

a) Traitement intensif des patients jeunes et sans comorbidité

La décision thérapeutique initiale pour un patient atteint de lymphome à cellules du manteau est principalement dictée par son âge ainsi que par son état de santé général.

En effet, pour les patients les plus jeunes sans comorbidité significative, le traitement de première ligne contenant de fortes doses de Cytarabine (HDAC) offre les meilleurs résultats. Cette thérapie est généralement consolidée par une chimiothérapie intensive et une greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques appelée aussi, autogreffe (Delarue et al., 2013; Geisler et al., 2008; Romaguera et al., 2005).

Dans un second temps, une greffe allogénique peut être également proposée en cas de rechute post-autogreffe. Des données récentes ont en effet démontré que 46% des patients ayant rechuté après autogreffe et recevant alors une allogreffe ont une survie globale de 2 ans, meilleure que celle des patients en rémission dès l'autogreffe (Campo and Rule, 2015).

Par ailleurs, d'autres approches thérapeutiques existent comme le Rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine de surface CD20 des lymphocytes B, combiné à des doses croissantes de Cyclophosphamide et associé à la Doxorubicine, la Vincristine (Oncovin) et la Prednisone (R-maxi-CHOP) alterné avec des doses de HDAC (Geisler et al., 2008) ainsi que du R-CHOP alternant avec des doses de Dexaméthasone, Cisplatine et Cytarabine (DHAP) (Fouquet et al., 2015; Jaccard et al., 2011). Ces schémas thérapeutiques sont généralement associés à une autogreffe.

D'autres schémas, sans autogreffe, existent : Il s'agit de l'utilisation hyperfractionnée de la Cyclophosphamide, de la Vincristine, de la Doxorubicine et de la Dexaméthasone alternée avec des fortes doses de Methotrexate et Cytarabine combinées à du Rituximab (R-hyper-CVAD/MA) (Romaguera et al., 2005) (**Figure 9**).

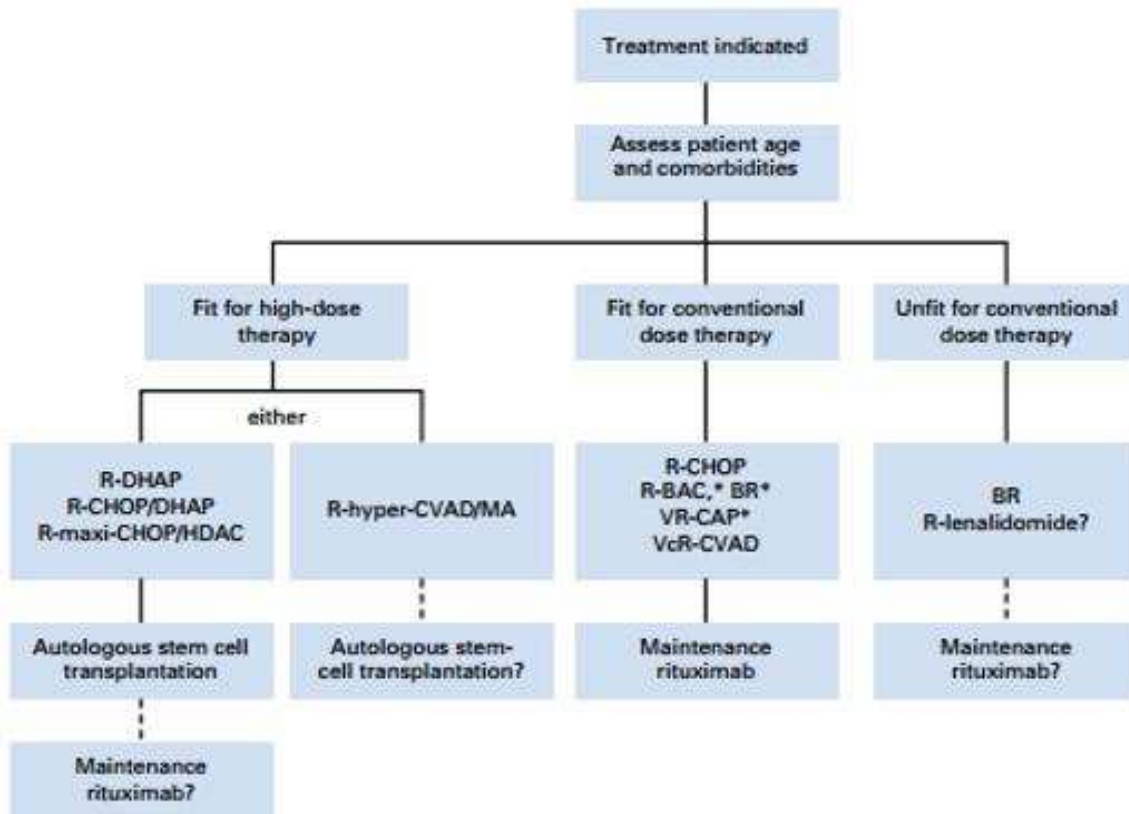


Figure 9. Algorithme décisionnel de traitements proposés pour les patients nouvellement diagnostiqués pour un lymphome à cellule du manteau (Cheah et al., 2016).

b) Traitements conventionnels

Pour les patients ne pouvant supporter une approche intensive, plusieurs alternatives thérapeutiques plus conventionnelles peuvent être proposées comme par exemple, le schéma R-CHOP seul résultant généralement en une survie médiane sans progression (PFS) de 16 à 22 mois (Lenz et al., 2005; Rummel et al., 2013) ou encore l'utilisation de la Bendamustine associée au Rituximab (BR) associant ou non la Cytarabine (Visco et al., 2013) (**Figure 9**).

En outre, une étude récente du GOELAMS a montré l'efficacité et la faible toxicité du schéma Rituximab, Vincristine, Adriamycine, Dexaméthasone et Chloraminophène (R-VAC+C) en première intention dans deux essais cliniques prospectifs de phase II.

Enfin, dernièrement la substitution de la Vincristine par le Bortezomib (Velcade), un inhibiteur de la sous-unité 26S du protéasome, dans le schéma R-CHOP a été étudiée dans un essai de phase III chez 487 adultes diagnostiqués pour le lymphome à cellules du manteau ne

pouvant recevoir de greffe de cellules souches hématopoïétiques. Il a alors été montré que ce schéma VR-CAP était plus efficace que le R-CHOP (médiane PFS 30.7 contre 16.1 mois, durée médiane de réponse complète: 40.6 contre 20.5 mois et taux de survie globale à 4 ans : 64% contre 54%) mais plus toxique (augmentation du taux de neutropénie et de thrombocytopénie) (essai LyMa).

c) Traitements des patients âgés

Enfin, pour les patients plus âgés, plusieurs thérapies moins intensives peuvent être proposées comme le Rituximab seul (Foran et al., 2000), aussi bien que le schéma Cyclophosphamide, Vincristine et Prednisolone (Meusers et al., 1989), le Chlorambucil (Sachanas et al., 2011), la Cladribine (Inwards et al., 2008) ou encore le Thalidomide (Kaufmann et al., 2004), habituellement associés au Rituximab (**Figure 10**).

2.2 Traitement dans les cas de rechutes ou réfractaires

Actuellement, il n'existe pas de thérapie de référence en cas de rechute. Généralement, une immuno-chimiothérapie alternative est proposée en fonction du traitement donné en première ligne mais la qualité et la durée des rémissions sont nettement inférieures à celles observées après les thérapies de première instance (Campo and Rule, 2015). Il s'agit par exemple, du schéma Rituximab, Gemcitabine et Oxaliplatine (Rodriguez et al., 2007), du R-DHAP (Witzig et al., 2008), du R-hyper-CVAD/MA (Wang et al., 2008), du schéma Rituximab, Fludarabine, Cyclophosphamide et Mitoxantrone (Forstpointner et al., 2006) ou encore du Bortezomib (Rummel et al., 2005).

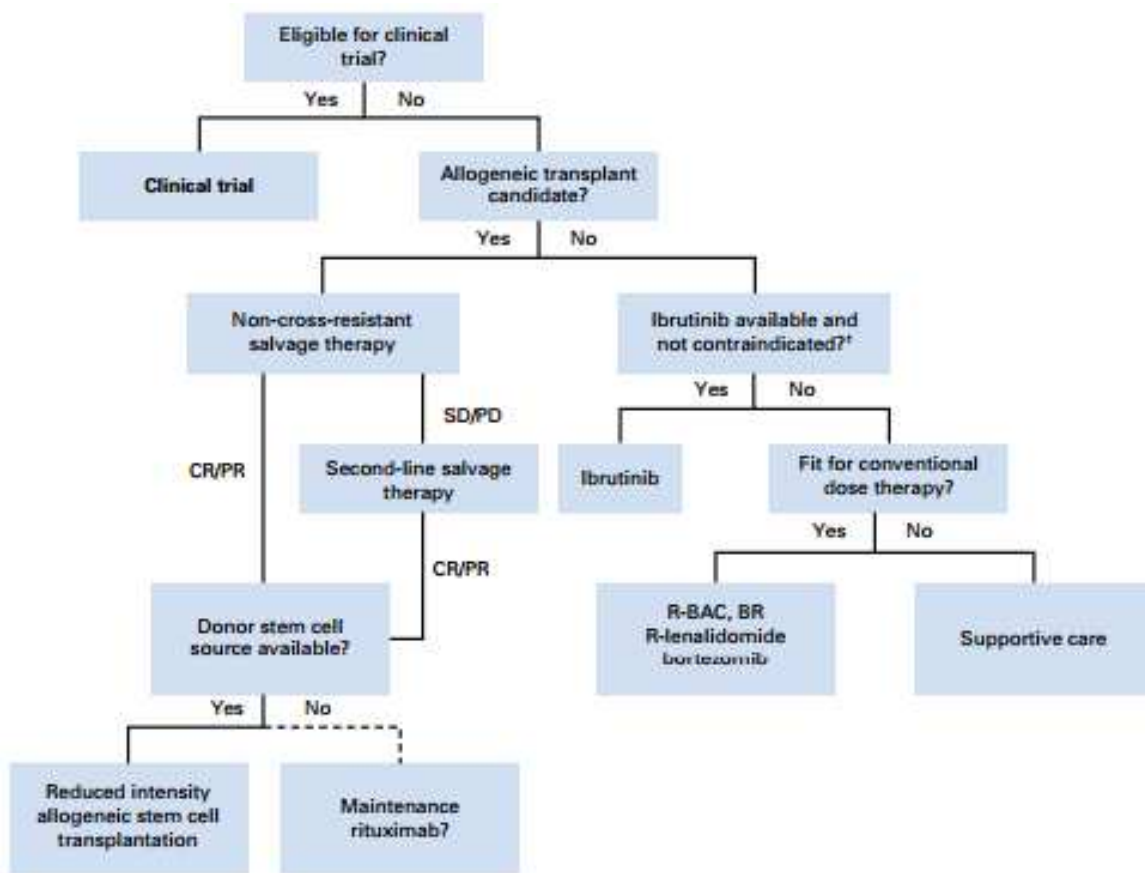


Figure 10. Algorithme décisionnel de traitements proposés pour les patients atteints de lymphome à cellules du manteau en rechute ou réfractaire au traitement appliqué (d'après (Cheah et al., 2016)).

2.3 Nouvelles options thérapeutiques

Très récemment, quatre drogues utilisées seules ou en association avec le Rituximab ont été testées dans les cas de lymphome à cellules du manteau en rechute ou réfractaire. Il s'agit du Bortezomib (Velcade), un inhibiteur du protéasome (Fisher et al., 2006) ; du Temsirolimus (Torisel), un inhibiteur spécifique de la voie mTOR (Ansell et al., 2011; Hess et al., 2009) ; du Lénalidomide (Revlimid), un dérivé du Thalidomide qui possède des propriétés antinéoplasiques en diminuant la prolifération des cellules hématopoïétiques malignes, des propriétés antiangiogéniques en inhibant la migration et l'adhésion des cellules endothéliales et des propriétés immunomodulatrices en bloquant la production de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-alpha ou encore l'interleukine 6 (IL-6) (Goy et al., 2013) et enfin de l'Ibrutinib (Imbruvica).

L'Ibrutinib est un inhibiteur irréversible de la tyrosine kinase de Bruton (BTK) impliquée dans la voie de signalisation issues du BCR qui joue un rôle important dans la survie des cellules B malignes (Dreyling et al., 2016) (**Figure 11**). Ainsi, par son action inhibitrice, l'Ibrutinib bloque les signaux qui stimulent la prolifération des cellules B malignes.

Cliniquement, l'Ibrutinib induit l'augmentation du nombre de lymphocytes circulants, un phénomène commun à la plupart des inhibiteurs du BCR (Zhao et al., 2017). L'Ibrutinib a montré des taux de réponse globale et une survie sans progression sans précédent dans les cas de lymphomes à cellules du manteau récidivant ou réfractaires ainsi que dans les leucémies lymphoïdes chroniques (Byrd et al., 2013). Malheureusement, malgré ces rémissions prolongées, les rechutes sont inévitables. En effet, 43% des patients atteints de lymphomes à cellules du manteau rechutent après 12 mois de traitement Ibrutinib seul et le taux de survie à un an n'est seulement que de 22% (Cheah et al., 2016; Wang et al., 2008). Des données similaires ont été obtenues dans les cas de leucémies lymphoïdes chroniques (Maddocks et al., 2015).

Récemment, il a été montré par des analyses protéomiques et des essais de drogues que le microenvironnement tumoral pouvait jouer un rôle dans l'efficacité de l'Ibrutinib et être impliqué dans la résistance à ce traitement. En effet, il semblerait que les cas de lymphomes à cellules du manteau résistants à l'Ibrutinib seraient capables de reprogrammer le kinome, c'est-à-dire l'ensemble des kinases présentes dans les cellules, ce qui annulerait l'effet inhibiteur de la kinase BTK par l'Ibrutinib. De plus, cette reprogrammation du kinome pourrait conduire également à l'activation réciproque de la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR et celle de l'intégrine $\beta 1$ (Zhao et al., 2017). Ainsi, la restauration de l'inhibition de la voie issue du BCR ainsi que celle de la voie PI3K-AKT-mTOR pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique combinatoire afin de supprimer les mécanismes de résistance et de ce fait restaurer la réponse au traitement Ibrutinib dans les patients atteints de lymphomes à cellules du manteau ainsi que dans les autres hémopathies malignes issues des cellules B.

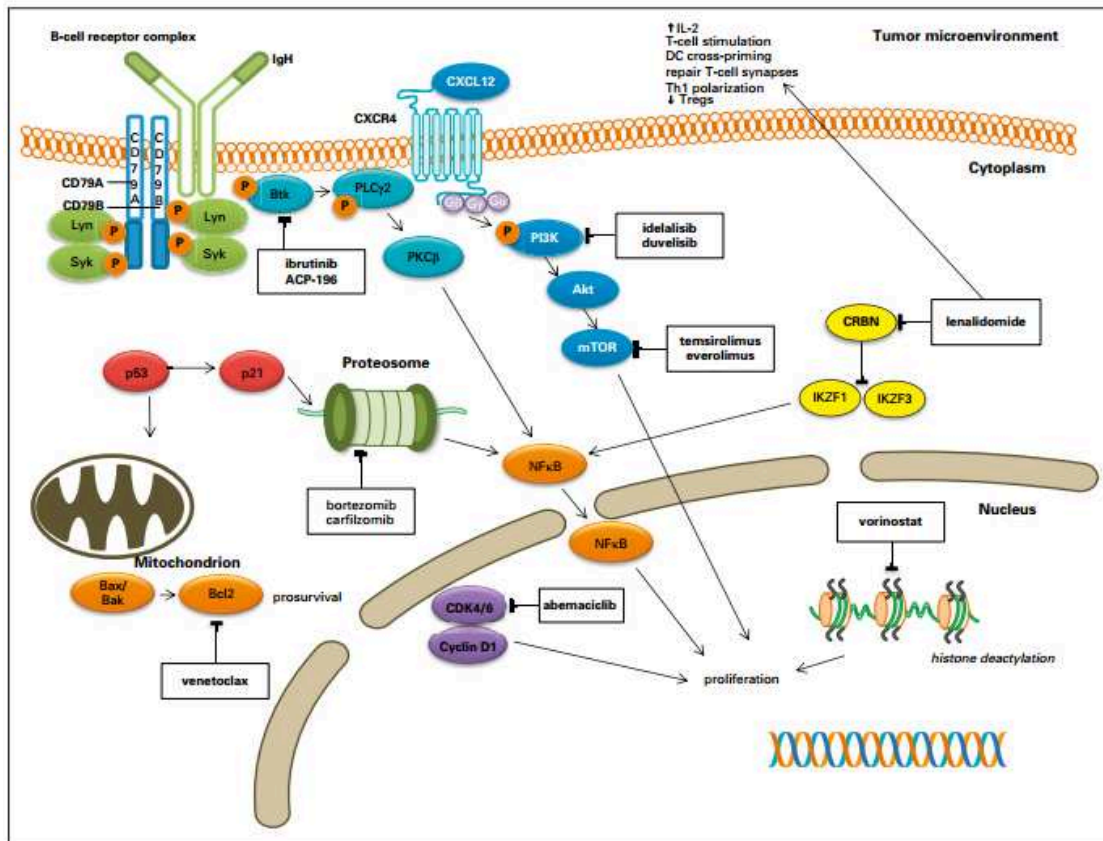


Figure 11. Nouvelles thérapies ciblant les principales voies de signalisation cellulaire dans le lymphome à cellules du manteau. Ces nouvelles thérapies inhibant des éléments clés de la signalisation cellulaire issue du récepteur aux cellules B (BCR) sont illustrées dans les boîtes blanches. Parmi elles, le Lenalidomide, le Temsirolimus, le Bortezomib et l'Ibrutinib ont été approuvées par la société « Food and Drug Administration » pour les patients en rechute ou réfractaires. Les autres drogues sont en cours d'essais cliniques. Akt (protéine kinase B), Bak (B-cell lymphoma-2 homologous antagonist killer), Bax (B-cell lymphoma-2-associated X protein), Bcl2 (B-cell lymphoma protein-2), Btk (Bruton tyrosine kinase), CDK (cyclin dépendent kinase), mTOR (la cible mammifère de la rapamycin), NFκB (nuclear factor κB), PI3K (kinase du phosphatidylinositol 3), PKCβ (protéine kinase cβ), PLCγ2 (phospholipase Cγ2), Syk (tyrosine kinase de la rate), Th (T-helper cell), Treg (cellules régulatrices T) *D'après* (Cheah et al., 2016).

Bien que les réponses aux traitements soient meilleures qu'auparavant, la diversité des thérapies proposées souligne bien le fait que la pathogenèse du lymphome à cellules du manteau reste difficile à comprendre et donc à traiter. Ceci est sans doute dû au caractère agressif mais aussi à l'hétérogénéité biologique de cette maladie. En effet, la progression de la maladie, les résistances aux traitements ainsi que les rechutes fréquentes constituent un véritable challenge pour les cliniciens et requièrent urgemment la mise en place de thérapies alternatives. Toutefois, la mise en place de ces thérapies alternatives ne peut être envisagée qu'après une analyse fine des mécanismes moléculaires à la base de la pathogénèse du lymphome à cellules du manteau. C'est pourquoi, nous nous intéresserons tout particulièrement à décortiquer cette pathogenèse moléculaire du lymphome à cellule du manteau dans la section suivante.

3. Pathogenèse moléculaire

3.1 Aberrations chromosomiques

L'anomalie génétique classiquement associée au lymphome à cellule du manteau est la translocation réciproque $t(11;14)(q13;q32)$ récurrente, responsable de la juxtaposition du gène *BCL-1* ou *PRAD-1* codant la cycline D1 (*CCND1*) (11q13), un régulateur du cycle cellulaire, sous le contrôle du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (*IgH*) (14q32) (**Figure 12**). Cette translocation conduit à la surexpression constitutive de la *CCND1* dans les lymphocytes B et de ce fait à des dérégulations du cycle cellulaire. En effet, au cours du cycle cellulaire *CCND1* se lie au complexe de kinases *CDK4/6* (Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6) et phosphoryle la protéine du rétinoblastome (*Rb*) libérant ainsi le facteur de transcription *E2F-1* qui régule la phase G1/S dans la synthèse de l'ADN (Sherr, 1994).

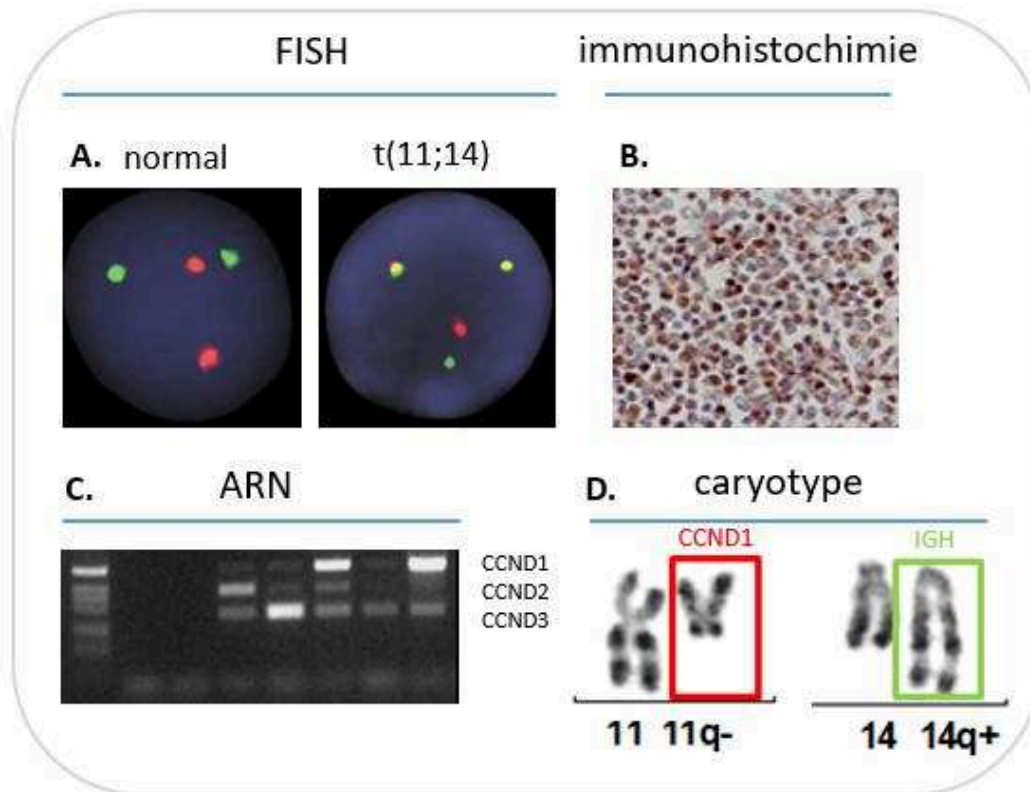


Figure 12. Caractéristiques biologiques du lymphome à cellules du manteau. (A) Analyse FISH (Fluorescence in situ hybridization) illustrant la translocation réciproque t(11 ;14)(q13 ;q32). Le signal rouge correspond à la sonde marquant la cycline D1 et le signal vert correspond à la sonde marquant IGH. (B) Marquage immunohistochimique anti-CCND1 pour la détection de la surexpression de la CCND1 (marquage anti-phosphatase alcaline). (C) Northern Blot illustrant la présence de transcrits CCND1, CCND2 et CCND3 chez des patients atteints de lymphomes à cellules du manteau (une colonne correspond à un patient). (D) Caryotype illustrant la translocation t(11 ;14)(q13 ;q32) par échange réciproque de matériel chromosomique (bras q) entre les chromosomes 11 et 14.

D'autres fonctions de la CCND1 indépendantes du cycle cellulaire pourraient également être altérées suite à cette translocation telles que la régulation directe de facteurs de transcription, la réparation de l'ADN ainsi que la régulation de certains mécanismes épigénétiques (Aggarwal et al., 2010; Bienvenu et al., 2010) (**Figure 13**).

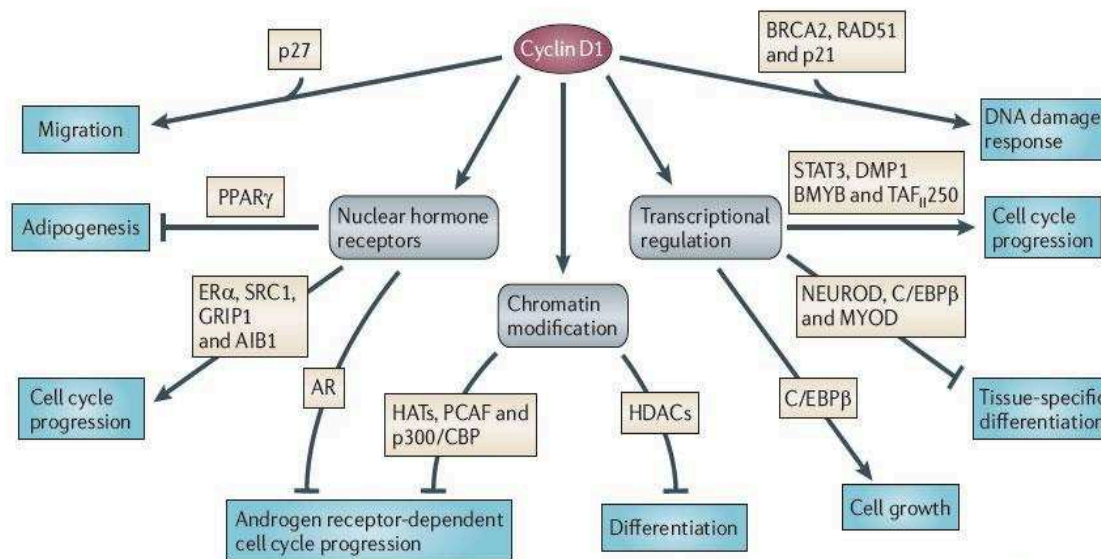


Figure 13. Les diverses fonction de la cycline D1. Bien que les protéines p21 et p27 soient des constituants du complexe CDK4/6, la CCND1 peut lier p21 et p27 indépendamment de la liaison de CDK4 ou CDK6, conduisant à des effets sur la migration et sur la réponse aux dommages de l'ADN. La CCND1 régule également la prolifération et la croissance cellulaire ainsi que la différenciation. Ceci suppose sa liaison à Er α (Estrogen receptor- α), AR (Androgen Receptor) et PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ) et leurs co-activateurs (SRC1 (SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase), GRIP1 (glutamate receptor interacting protein 1) et AIB1 (nuclear receptor coactivator 3), BMYB (MYB proto-oncogene like 2) et DMP1 (MYB-related transcription factor DMP1) aussi bien que NEUROD (helix-loop-helix transcription factors neurogenic differentiation factor 1), MYOD (myogenic differentiation 1) et C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta). CCND1 se lie également à des enzymes modifiant la chromatine telles que les HATs (Histone Acetyltransferases) comme P/CAF et p300/CBP et les HDACs (Histone Deacetylases). Des effets plus généraux sur la transcription peuvent aussi résulter de la liaison de CCND1 à TAF_{II}250 (aussi connu sous TAF1), une sous-unité de la machinerie transcriptionnelle basale. D'après (Musgrove et al., 2011).

Il existe, cependant, un sous-groupe minoritaire (moins de 5%) de lymphomes à cellules du manteau dépourvu de t(11;14)(q13;q32), pour lesquels la CCND1 n'est pas surexprimée mais montrant plutôt une surexpression de la cycline D2 (CCND2) ou de la cycline D3 (CCND3) (Fu et al., 2005; Gesk et al., 2006). La dérégulation de l'expression de CCND2 et CCND3 pourrait alors être une voie alternative compensatoire favorisant la progression du cycle cellulaire lorsque la CCND1 est absente (**Figure 12**).

D'autres perturbations génétiques sont vraisemblablement associées à la pathogenèse du lymphome à cellules du manteau. D'ailleurs, il a été montré que des souris transgéniques pour la CCND1 ne développent pas forcément de lymphome à cellules du manteau, ce qui suggère que la surexpression de la CCND1 ne suffit pas à expliquer complètement le développement de cette maladie (Katz et al., 2014). Cette hypothèse est également étayée par le fait que les cas de lymphomes à cellules du manteau comportent un haut degré d'instabilité génomique incluant des gains, des pertes, des amplifications ou des délétions de nombreuses régions chromosomiques.

En ce sens, de nouvelles technologies de séquençage haut débit telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS) a récemment révélé l'acquisition de nombreuses mutations génétiques somatiques associées à la pathogenèse du lymphome à cellules du manteau.

3.2 Paysage mutationnel du lymphome à cellules du manteau-vue générale

Avec l'émergence récente des nouvelles technologies de séquençage nouvelle génération telles que le séquençage du génome entier (WGS), le séquençage de l'exome entier (WES) ou encore le profilage de l'expression des micro-ARNs (ARNmi), de plus en plus d'études rapportent de nouvelles perturbations génétiques au sein du lymphome à cellules du manteau.

Par exemple, l'équipe d'E. Campo décrit les mutations somatiques de 29 cas de lymphomes à cellules du manteau par WES ainsi que le séquençage ciblé d'une cohorte indépendante de 172 patients. Parmi eux, 69% (20/29 cas) sont des échantillons collectés au diagnostic tandis que 21% sont recueillis après traitement et 10% après progression/rechute de

la maladie. De plus, 60% de ces échantillons proviennent du sang périphérique et 32% de ganglions lymphatiques (5% colon/amygdale ; 3% rate).

Cette équipe a identifié 25 gènes significativement mutés de façon récurrente dans le lymphome à cellules du manteau, les plus fréquemment mutés étant ceux codant pour les protéines ataxia telangiectasia mutée ATM (41.4% ; 12/29), la cycline CCND1 (34.5% ; 10/29), le suppresseur de tumeur TP53 (31% ; 8/29), les méthyltransférases MLL2 (14% ; 4/29) et WHSC1 (14% ; 4/29), l'ubiquitine ligase BIRC3 (6% ; 3/29), le facteur de transcription MEF2B (3% ; 2/29) et le récepteur de type Toll, TLR2 (1% ; 2/29). D'autres mutations, plus rares (<1%), sont également décrites comme par exemple, les mutations au sein du gène codant le facteur de transcription LUZP4 (Leucine Zipper Protein 4), l'enzyme DCP1B (mRNA-decapping enzyme 1B) et la protéine SP140 (nuclear body protein) (Bea et al., 2013) (**Figure 14**).

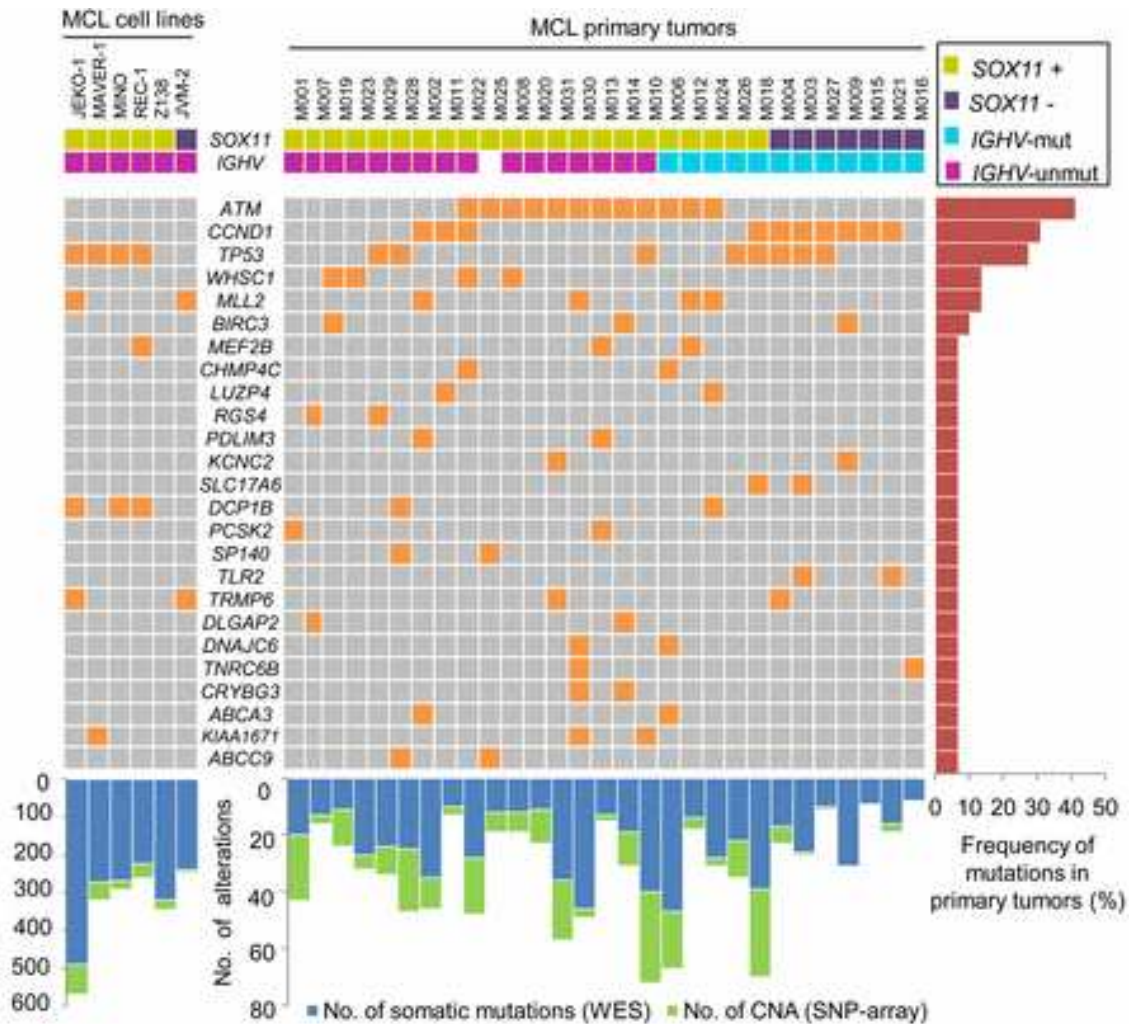


Figure 14. WES effectué sur 29 cas et 6 lignées cellulaires dérivées de lymphomes à cellules du manteau (MCL). Heatmap représentant les 37 cas étudiés. Chaque ligne représente un gène pour lequel un variant somatique a été identifié et chaque colonne représente une tumeur primaire ou une lignée cellulaire de MCL. Les barres verticales représentent le nombre total de mutations somatiques identifiées par WES (bleu) et le nombre d'altérations du nombre de copie d'ADN (CNA) détectées par SNP array (vert). Les caractéristiques de l'échantillon (expression SOX11, statut du gène IGHV) sont représentées par les cases de couleur vertes (SOX11+), violettes (SOX11-), fuchsia (IGHV non muté) et cyan (IGHV muté) (Bea et al., 2013).

En 2013, l'équipe de Gascoyne a effectué du séquençage sur ARN issus de 18 patients et deux lignées cellulaires dérivées de lymphomes à cellules du manteau (Mino et Jeko-1), permettant d'identifier 18 gènes mutés de façon récurrente : ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATMIN (ATM interactor), CCND1 (cyclin D1), CD14 (CD14 molecule), CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A), CHD2 (chromodomain helicase DNA binding protein 2), CHEK1 (checkpoint kinase 1), CHEK2 (checkpoint kinase 2), CUL1 (cullin 1), ETS1 (ETS proto-oncogene 1, transcription factor), MEF2B (myocyte enhancer factor 2B), NOTCH1 (notch 1), PTPRCAP (protein tyrosine phosphatase, receptor type C-associated protein), RB1 (RB transcriptional corepressor 1), TET2 (tet methylcytosine dioxygenase 2), TP53 (tumor protein p53), TRAF2 (TNF receptor associated factor 2) et UBR5 (ubiquitin protein ligase E2 component n-recognin 5). De façon intéressante, des mutations fréquentes au sein du gène UBR5, codant pour une ubiquitine ligase E3, ont été décrites pour la première fois et ce de façon inattendue dans 17,6 % (18/102) des cas dont 15 cas au diagnostic et 3 cas en rechutes (1 non-sens, 7 faux-sens, 3 indels et 7 sites d'épissage) (Meissner et al., 2013).

Suite à ces expériences de séquençage sur ARN, 92 cas de lymphomes à cellules du manteau pris au diagnostic ont été reséquencés par séquençage ciblé. Cette étude a permis d'identifier des mutations principalement au sein de: ATM (50%), CCND1 (18,6%), MEF2B (6,8%), NOTCH1 (12%), TP53 (13,7%) et TRAF2 (4,9%), toutes confirmées par séquençage Sanger. Parallèlement, une autre étude de l'équipe de Gascoyne a montré d'ailleurs que les mutations au sein du gène NOTCH1 et particulièrement les mutations délétères survenant dans le domaine PEST (proline (P), acide glutamique (E), sérine (S), thréonine (T)) de NOTCH1 seraient associées à un mauvais pronostic ($p=.003$) (Kridel et al., 2012).

Plus récemment encore, le paysage génétique du lymphome à cellules du manteau a été décrit par Zhang et al., à travers le WES de 56 cas parmi lesquels 78,5% (44/56 cas) des échantillons sont des ganglions lymphatiques, 8,5% (5/56) sont des rates et 12,5% des échantillons provenant de sources diverses (2 amygdales, 2 masses nasopharyngienne, 1 masse axillaire, 1 masse inguinale, 1 masse provenant de l'estomac). Cette équipe a confirmé les mutations au sein des gènes ATM (42,8% ; 24/56), TP53 (19,6% ; 11/56), MLL2 (19,6% ; 11/56), CCND1 (16% ; 9/56) et NOTCH1 (14,2% ; 8/56) et a identifié de nouvelles mutations pertinentes au sein des méthyltransférases MLL3 (16% ; 9/56) et WHSC1 (7,1% ; 4/56), du régulateur chromatinien SMARCA4 (SWI/SNF related matrix associated, actin dependent

regulator of chromatin, subfamily a, member 4) (14.2% ; 8/56), des suppresseurs de tumeurs RB1 (RB transcriptional corepressor 1) (10.7% ; 6/56) et DLC1 (DLC1 Rho GTPase activating protein) (9% ; 5/56), de l'ubiquitine ligase BIRC3 (baculoviral IAP repeat containing 3) (9% ; 5/56), des cadhérines FAT4 (FAT atypical cadherin 4) (9% ; 5/56) et CDH8 (cadherin 8) (3.5% ; 2/56), des facteurs de transcriptions SALL3 (sal-like transcription factor 3) (9% ; 5/56), ZNF296 (Zinc finger protein 296) (7.1% ; 4/56), ZNF117 (Zinc finger protein 117) (5.4% ; 3/56) et ESX1 (ESX homeobox 1) (5.4% ; 3/56), de la protéine POT1 (protection of telomere 1) (5.4% ; 3/56) impliquée dans la protection des télomères, de la kinase EIF2AK4 (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4) (5.4% ; 3/56), de la caténine CTNNA2 (catenin alpha 2) (5.4% ; 3/56), de la deshydrogénase OGDHL (oxoglutarate dehydrogenase-like) (5.4% ; 3/56) et de l'ATPase ATP11C (ATPase phospholipid transporting 11 C) (3.5% ; 2/56) (Zhang et al., 2014) (**Figure 15**).

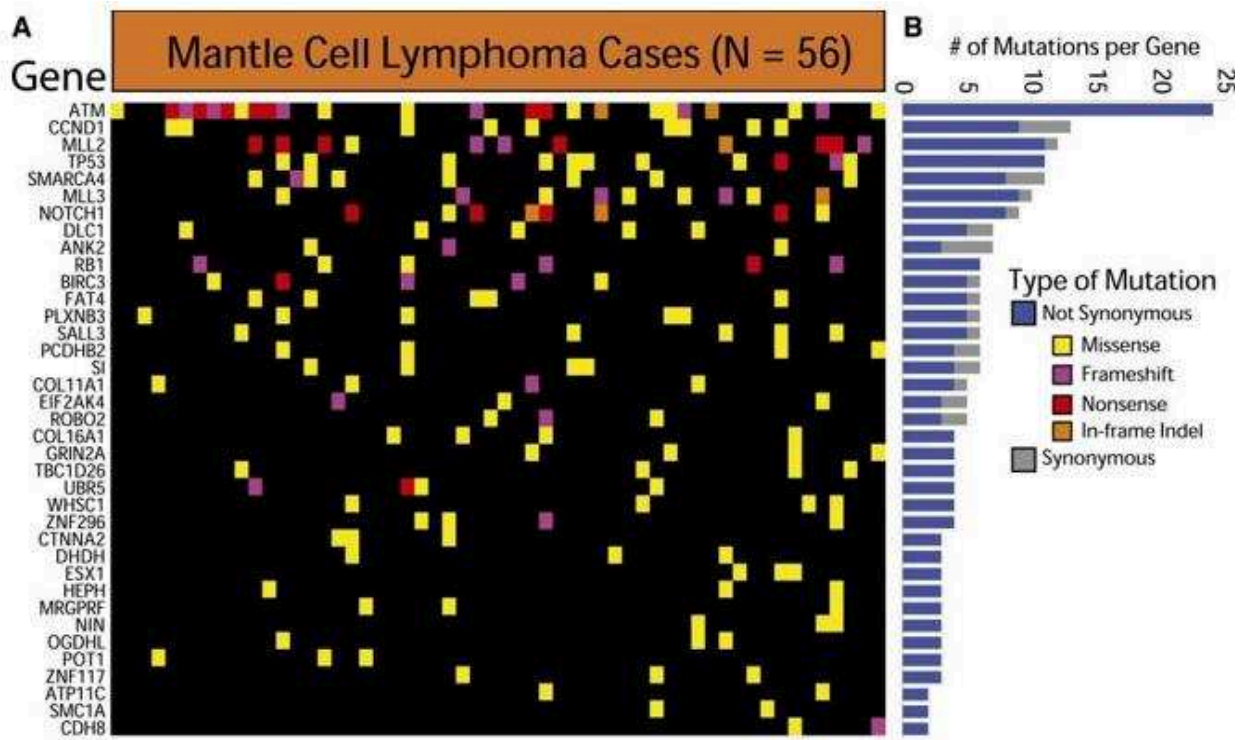


Figure 15. Le séquençage exonique du lymphome à cellules du manteau révèle des gènes mutés de façon récurrente. (A) Heatmap illustrant le profil de mutations non-synonymes des 37 gènes les plus fréquemment mutés dans une cohorte de 56 cas de lymphomes à cellules du manteau. Chaque colonne représente un patient, et chaque ligne représente un gène. Mutations faux-sens (jaune), mutations avec décalage du cadre de lecture (violet), mutation non-sens/ stop (rouge), insertions ou délétion avec conservation du cadre de lecture (orange). **(B)** L'histogramme indique la fréquence des variants identifiés pour chaque gène dans l'ensemble de la cohorte, subdivisé en mutations non-synonymes (bleu) et mutations synonymes (gris). *D'après (Zhang et al., 2014).*

Il a été également décrit par cette équipe que le paysage mutationnel du lymphome à cellules du manteau est distinct de celui des autres lymphomes issus des cellules B. Dans ce contexte, des études de la structure chromatinienne de tumeurs primaires issues de lymphocytes B naïfs, du centre germinatif ainsi que de lymphocytes B mémoires, ont été réalisées pour la première fois à partir d'expériences d'immunoprécipitation de la chromatine couplée à un séquençage à haut débit (ChIP seq). Ainsi, il a été démontré que les mutations somatiques survenant plus fréquemment dans le lymphome à cellules du manteau sont associées à une structure ouverte (euchromatine, ADN actif) de la chromatine. De ce fait, ce travail a permis de montrer la connexion entre la structure de la chromatine et l'acquisition de mutations génétiques somatiques dans le lymphome à cellules du manteau (Zhang et al., 2014).

Parallèlement, Rahal et al., a étudié une cohorte de 165 échantillons primaires de lymphomes à cellules du manteau par séquençage ciblé et a également confirmé les mutations au sein des gènes ATM (49.6% ; 82/165), CCND1 (18.8% ; 31/165), UBR5 (18,1% ; 30/165), MLL3 (26/165 ; 15,7%), TP53 (23/165 ; 13.9%), NOTCH1 (23/165 ; 14%), BIRC3 (8% ; 16/165).

De nouvelles mutations ont également été identifiées telles que les mutations au sein de gènes codant l'ubiquitine ligase TRAF2 (7% ; 10/165) et de la kinase MAP3K14 (Mitogen-Activated Protein 3 Kinase 14), également appelée NIK (Kinase inhibitrice de la voie NF- κ B) (2% ; 3/165), toutes deux impliquées dans une voie de signalisation alternative (non-canonique) NF- κ B. Ces altérations au sein de TRAF2 et MAP3K14 pourraient constituer un mécanisme possible de résistance des patients aux thérapies inhibitrices de la voie de signalisation issue du BCR telles que l'Ibrutinib, un inhibiteur de BTK (Tyrosine Kinase de Bruton). En effet, ces patients réfractaires à l'Ibrutinib auraient activé cette signalisation NF- κ B alternative, suite aux mutations TRAF2 et/ou MAP3K14. Ainsi, MAP3K14, pourrait être considérée comme la nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du lymphome à cellules du manteau en restaurant son inhibition via TRAF2 (Zhang et al., 2014) (**Figure 16**).

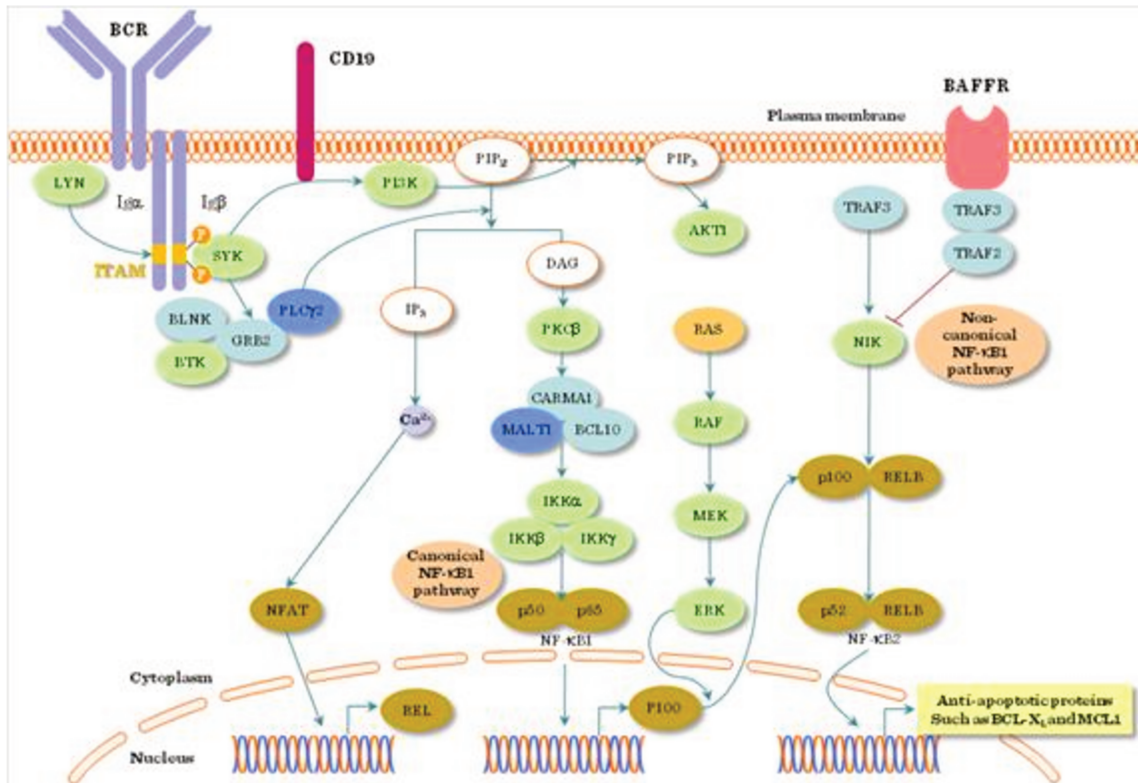


Figure 16. Voie de signalisation cellulaire issue du BCR (d'après Berki et al, ouvrage « Signal Transduction », université de Pécs, 2011).

Enfin, récemment, Rossi et al., a exploré la pertinence clinique des mutations précédemment identifiées dans un essai prospectif de phase III chez des patients jeunes atteints de lymphomes à cellules du manteau traités par R-CHOP, suivi de fortes doses de cytarabine et greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques, en séquençant en profondeur (2356x), 151 échantillons d'ADN issus de cellules purifiées CD19⁺ de moelle osseuse avec un panel de 8 gènes : ATM, CCND1, TP53, MLL2, WHSC1, BIRC3, TRAF2 et NOTCH1. Globalement, au moins une mutation a été détectée dans 70% (106/151) des cas, incluant des mutations au sein des gènes ATM (42%), CCND1 (14%), WHSC1 (13%), MLL2 (12%), TP53 (7%), NOTCH1 (6%), BIRC3 (5%) et TRAF2 (1%). Une analyse univariée a d'ailleurs démontré que les mutations TP53 et MLL2 sont associées à une plus courte survie sans progression (PFS) : (TP53 : PFS de 2 ans de 48% vs 82% ; $p > 0.0001$ et MLL2 : PFS de 2 ans 67% vs 81% ; $p = 0.004$). Ainsi, les gènes TP53 et MLL2 pourraient être considérés comme de nouveaux biomarqueurs pronostiques chez les patients jeunes atteints de lymphomes à cellules du manteau traités par R-CHOP, cytarabine et greffe autologue (**Figure 17**).

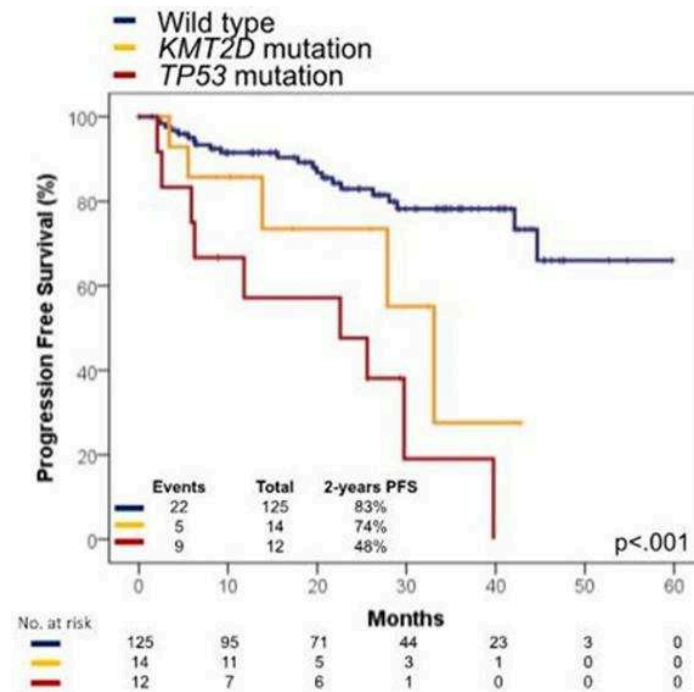


Figure 17. Survie sans progression en fonction du statut mutationnel des gènes TP53 et KMT2D (MLL2) chez des patients jeunes atteints de lymphomes à cellules du manteau et traités par R-CHOP, cytarabine et greffe autologue. Patients non mutés (courbe bleue), patients mutés pour KMT2D (courbe jaune), patients mutés pour TP53 (courbe rouge).

L'ensemble de ces études permettent de mettre en évidence que les mutations somatiques récurrentes associées au lymphome à cellules du manteau affectent surtout cinq voies de signalisation cruciales des cellules B. Il s'agit des voies de signalisation associées au BCR, au TLR (Toll-like receptor), ainsi qu'à NOTCH, NF- κ B et aux protéines kinases MAPK. D'ailleurs, le rôle de la voie alternative NF- κ B dans les cas de lymphomes à cellules du manteau résistants à l'Ibrutinib a été discuté précédemment (Rahal et al., 2014).

Il est cependant intéressant de souligner que d'autres mutations telles que celles au sein du domaine RING de la protéine BIRC3 ont le potentiel de transformer directement les cellules normales en cellules cancéreuses, indépendamment de la voie NF- κ B. Ces mutations conduisent à la troncature du domaine RING de la protéine BIRC3, impliqué dans son rôle d'ubiquitination. Ainsi, la protéine BIRC3 semblerait également être un acteur clé dans la pathogenèse moléculaire du lymphome à cellules du manteau (Rahal et al., 2014).

Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer l'impact biologique de ces mutations somatiques sur la signalisation cellulaire pour mieux caractériser la pathogenèse

moléculaire du lymphome à cellules du manteau et ainsi développer des thérapies plus ciblées.

3.3 Mutations génétiques affectant la signalisation cellulaire

a) Mutations au sein de complexes intervenant dans la réparation de l'ADN

Comme rapporté précédemment, l'équipe de Campo a identifié, par WES des mutations ATM dans 41% (12/29) des cas de lymphome à cellules du manteau et uniquement dans des tumeurs SOX11-positive (n=22/29). Parmi elles, 6 mutations sont associées à des délétions 11q et surviennent principalement dans des ganglions lymphatiques prélevés au moment du diagnostic. Il est intéressant de noter toutefois, la présence d'une de ces 6 mutations dans des échantillons synchroniques (ganglion lymphatique et sang périphérique prélevés en même temps au moment du diagnostic). Par ailleurs, 5 cas sans délétion 11q ont deux mutations ATM différentes par cas et seulement un cas, sans délétion 11q, a une seule mutation ATM (Bea et al., 2013). Ces mutations tronquent ou affectent principalement des domaines fonctionnels de la protéine ATM tels que le domaine « leucine zipper », capable de se lier à l'ADN, le domaine homologue de l'hélicase RAD3 (ATR checkpoint kinase Rad3) (*S.pombe*) ou le domaine kinase homologue de la famille des PI3-kinases (phosphatidylinositol-3'-kinase) intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire et la stabilité chromosomique.

Le gène ATM (11q22-23) dont le déficit est responsable du syndrome de Louis-Bar, est le plus communément muté (41%) dans le lymphome à cellules du manteau (Bea et al., 2013) (**Figure 18**). Ce gène code pour la sérine/thréonine kinase ATM, intervenant dans le mécanisme de réparation de l'ADN. En effet, suite à des cassures double brins de l'ADN, ATM, physiologiquement sous la forme d'un dimère inactif, est recrutée, s'auto-phosphoryle au niveau de la sérine 1981 et se dédimérise ; ce qui conduit à son activation. Une fois activée, ATM phosphoryle alors le variant d'histone H2AX, chargé du recrutement des protéines TP53BP1 (tumor suppressor p53-binding protein 1), BRCA1 (breast cancer 1), CHK1 (check point kinase 1) et CHK2 (check point kinase 2) qui seront, à leur tour, phosphorylées par ATM. Ces protéines sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire mais aussi dans l'activation de points de contrôle nécessaires dans la réparation de l'ADN endommagé (Lavin and Kozlov, 2007).

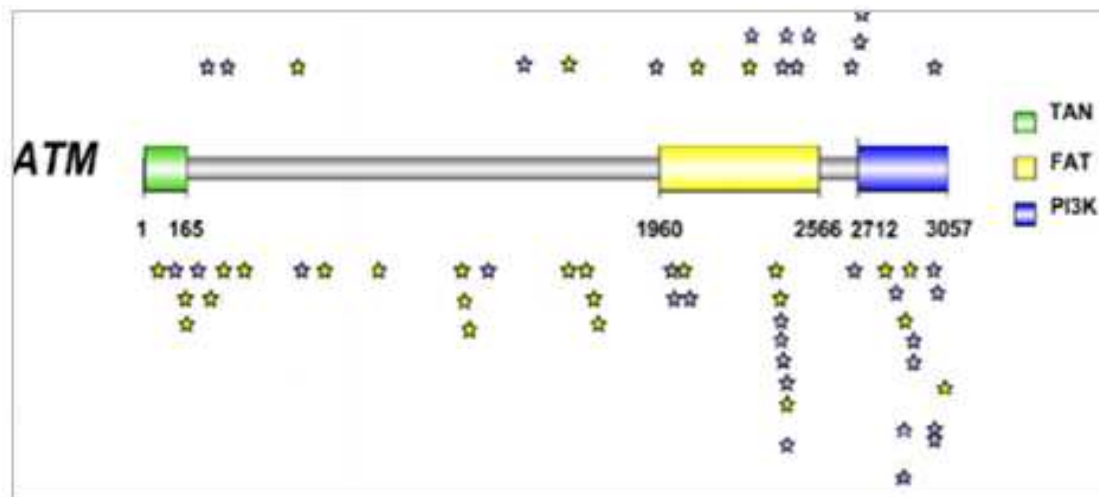


Figure 18. Distribution des mutations du gène ATM détectées par WES dans des cas de lymphome à cellules du manteau. Partie du haut : mutations ATM décrites dans Bea S et al., PNAS, 2013 ; Partie du bas : mutations ATM décrites dans Ondrejka SL et al., Haematologica, 2011 et Royo C et al., Leukemia, 2012. Etoiles jaunes : mutations tronquantes, étoiles violettes : mutations faux-sens. *Schéma adapté d'après* (Bea et al., 2013).

Le rôle des mutations ATM seules au sein du lymphome à cellules du manteau est controversé et il est rapporté que ces mutations n'affecteraient pas la survie globale des patients jeunes atteints de lymphome à cellules du manteau et traité par R-CHOP, cytarabine et greffe autologue (Rossi et al., 2015). A contrario, la combinaison des mutations ATM et TP53 intervenant tous deux dans le mécanisme de réparation de l'ADN pourrait conduire à des anomalies génétiques délétères.

b) Mutations affectant l'ubiquitination

i. Mutations UBR5

Comme rapporté précédemment, l'équipe de Gascoyne a identifié pour la première fois des mutations UBR5 dans 17,6% (18/102 ; 15 cas au diagnostic et 3 rechutes) des cas de lymphomes à cellules du manteau (Meissner et al., 2013). Ce gène UBR5, qui n'a pourtant jamais été décrit comme étant directement impliqué dans la lymphogenèse, est désormais considéré comme le troisième gène le plus fréquemment muté au sein des lymphomes à

cellules du manteau et constitue donc potentiellement un évènement pathogénique critique dans cette maladie (Meissner et al., 2013) ainsi qu'un facteur pronostic pertinent chez les patients et particulièrement ceux traités par le Velcade, un inhibiteur du protéasome (Meissner et al., 2013). Outre sa fonction d'ubiquitine ligase permettant le ciblage des protéines devant être dégradées par le protéasome, UBR5 est impliquée dans des interactions entre protéines, impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN (Henderson et al., 2006), le contrôle du cycle cellulaire (Benavides et al., 2013) ; (Munoz et al., 2007), la répression génique médiée par des microARNs (Su et al., 2011) ou encore les modifications de la chromatine (Gudjonsson et al., 2012).

Contrairement aux mutations délétères du gène UBR5 décrites dans d'autres cancers tels que le cancer du sein, du rein, du poumon ou encore de l'intestin, celles découvertes dans le lymphome à cellules du manteau, se trouvent toutes au niveau du domaine c-terminal HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus), en amont du résidu cystéine en position 2768 hautement conservé et connu pour lier de façon réversible l'ubiquitine (Meissner et al., 2013). En effet, ces mutations, à l'origine d'épissages défectueux sont responsables de la survenue d'un codon stop prématuré aboutissant à la troncature de la protéine UBR5 en amont de cette cystéine et donc à la perte de la fonction d'ubiquitination de UBR5 (**Figure 19**).

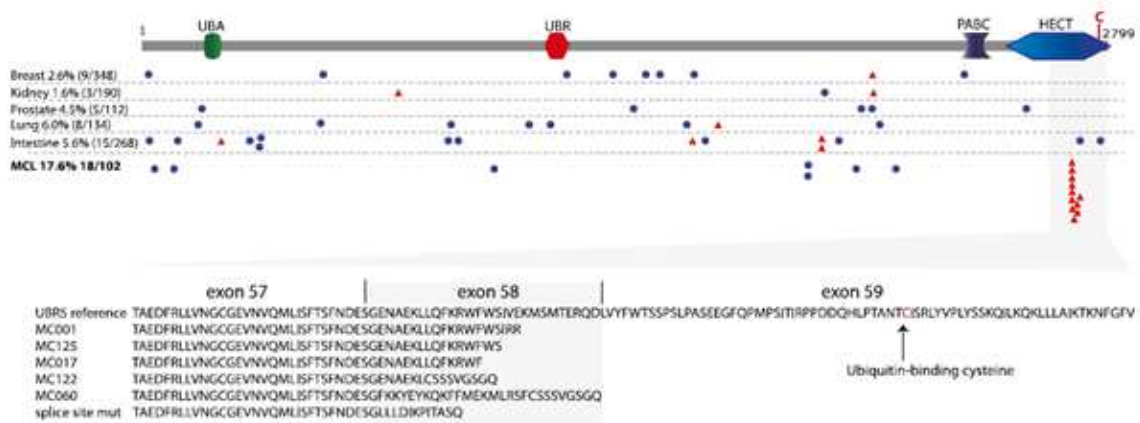


Figure 19. Distribution des mutations UBR5 observées dans le lymphome à cellules du manteau et dans les cancers solides (sein, reins, prostate, poumon et intestin). A. Structure de la protéine UBR5 avec un domaine associé à l'ubiquitine (UBA), une boîte UBR (un domaine en doigt de zinc), un domaine c-terminal polyadénylé de liaison à la protéine C (PABC) et un domaine c-terminal HECT. Les mutations reportées dans les autres cancers sont présentes à faible fréquence et sont distribuées sur l'ensemble de la protéine UBR5. Cercles bleus : mutations faux-sens, triangles rouges : mutations délétères. Toutes les mutations délétères trouvées dans le MCL sont regroupées au niveau de la partie c-terminale du domaine HECT, en amont du résidu cystéine conservé en position 2768. B. Alignement des diverses protéines UBR5 mutantes tronquées prédisant la perte de la liaison à l'ubiquitine et de ce fait, de la fonction de transfert qui en est associée. Adapté d'après (Meissner et al., 2013).

ii. Mutations FBXO25 et HAX1

D'autres altérations génétiques affectant le système ubiquitine-protéasome ont été décrites de façon récurrente dans le lymphome à cellules du manteau. Il s'agit, par exemple, des délétions FBXO25 (F-box protein 25) et des mutations HAX1 (pro survival protein HCLS1-associated protein X-1). FBXO25 exercerait une fonction d'ubiquitine-ligase de HAX-1 en vue de sa dégradation protéosomale, en réponse à un stimulus apoptotique (Hagens et al., 2006).

En effet, cinq études d'hybridation génomique comparative (FHP) indépendantes, conduites sur un total de 189 cas de lymphomes à cellules du manteau, ont permis d'identifier la présence de délétions mono allélique du gène FBXO25, localisé en 8p23.3, dans 24.3% des cas (Flordal Thelander et al., 2007; Martinez-Climent et al., 2001; Rubio-Moscardo et al., 2005; Schraders et al., 2005; Tagawa et al., 2005).

Les mutations HAX1 ont été, quant à elles, identifiées dans 4/114 cas de lymphome à cellules du manteau par séquençage de Sanger au niveau de la sérine 210. Ce résidu est d'ailleurs directement impliqué dans la phosphorylation de HAX1 par FBXO25, nécessaire à sa dégradation protéosomale. Ainsi, cette mutation augmenterait la stabilité de la protéine HAX1 dans ces cas de lymphomes à cellules du manteau. Ceci semble suggérer que HAX1 jouerait un rôle de proto-oncogène dans cette maladie et, plus largement, que les mutations phosphodegron (séquence d'acides aminés d'une protéine importante pour la régulation de sa propre dégradation) seraient un mécanisme oncogénique (Baumann et al., 2014). Il est intéressant de noter enfin, que ces mutations HAX1 et ces délétions FBXO25 sont mutuellement exclusives.

c) Mutations affectant le cycle cellulaire

De nombreuses études rapportent des mutations CCND1 au sein du lymphome à cellules du manteau. Parmi elles, Beà et al., CCND1 (34.5%) ; Zhang et al., CCND1 (16%) ; Rahal et al., CCND1 (19%) ; Kridel et al., CCND1 (19%) ; Meissner et al., CCND1 (18.6%) et Rossi et al., CCND1 (14%). Il a été également rapporté que les mutations CCND1 sont plus fréquentes dans les cas SOX11 négatifs [6/7 (86%) vs 4/22 (18%) ; $p=0.03$] et dans les cas avec un statut IGHV- muté [7/12 (58%) vs 3/16 (19%), $p=0.05$] (Bea et al., 2013).

Les inhibiteurs des cyclines dépendantes des kinases (CDK) tels que le Flavopiridol a fait l'objet de plusieurs essais cliniques utilisé seul (Jones et al., 2014) ou en combinaison avec le Bortezomib (Holkova et al., 2011) mais les effets du Flavopiridol sont encore discutés. De plus, il a été montré que le Flavopiridol pourrait jouer un rôle dans l'inactivation de la voie PI3K-AKT, ce qui conduirait à l'acquisition de nouvelles mutations impliquées dans la résistance à l'Ibrutinib (Chiron et al., 2014).

Plus récemment, Olshavsky et al., a décrit dans le cancer de la prostate, le variant cycline D1b, produit par l'épissage alternatif du transcrit CCND1. En effet, le polymorphisme en position G/A870 (rs9344) situé au niveau du site d'épissage donneur à la frontière de l'exon 4-intron 4, affecte le site de liaison du facteur SF2 (Splicing Factor 2), à l'origine de la production de ce variant (Olshavsky et al., 2010) (**Figure 20**).

Il est intéressant de noter que le potentiel oncogénique de cycline D1b est décrit comme étant plus important que celui de la cycline D1a « full-length » (Olshavsky et al., 2010). La fréquence de ce variant au sein d'une cohorte de patients atteints de lymphome à cellules du manteau n'a pas été encore explorée.

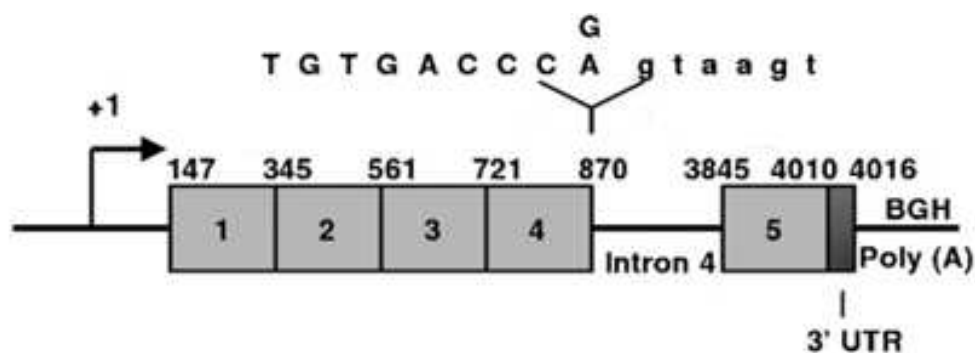


Figure 20. Mécanisme d'épissage à la base de la production du transcrit cycline D1b. La flèche +1 indique le début de la transcription. Les boîtes gris clair représentent les exons 1-5 et la boîte gris foncé correspond à la région 3' UTR. Le polymorphisme G/A870 est indiqué (la numérotation est en nucléotides). *D'après* (Olshavsky et al., 2010).

3.4 Mutations génétiques affectant l'expression génique

a) Mutations au sein de facteurs de transcription

i. Mutation NOTCH1

La voie de signalisation cellulaire NOTCH est une voie de communication juxtacrine entre deux cellules en contact l'une et l'autre. Cette voie est activée par la liaison du récepteur transmembranaire NOTCH à l'un de ses ligands, les protéines DELTA et SERRATE. Ce récepteur est constitué d'un domaine extra cytoplasmique composé de motifs caractéristiques des récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor) responsables de l'interaction de NOTCH avec ses ligands ainsi que de signaux de localisation nucléaire (NLS) et d'un domaine PEST (proline (P), acide glutamique (E), sérine (S), thréonine (T)) impliqué dans la dégradation de la protéine NOTCH par le protéasome.

La liaison des ligands au récepteur NOTCH induit immédiatement une cascade de deux clivages protéolytiques du récepteur par les enzymes KUZBANIAN et γ -SECRETASE libérant respectivement le domaine extra cytoplasmique, d'une part et les domaines transmembranaires et intra cytoplasmique, d'autre part. Une fois clivé, le domaine intra cytoplasmique est transporté dans le noyau où il formera un complexe de régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes cibles.

Comme indiqué précédemment, des mutations récurrentes au sein du gène NOTCH1 ont été identifiées dans 12% des patients atteints de lymphome à cellules du manteau (14/121 cas) et dans 20% des lignées cellulaires dérivées du lymphome à cellules du manteau (2/10 cas) par séquençage du transcriptome (ARN) global (Kridel et al., 2012). Ces mutations ciblent majoritairement le domaine PEST (86% ; 12/14 cas) et/ou le domaine d'hétérodimérisation de la protéine NOTCH1 (**Figure 21**).

NOTCH1 protein

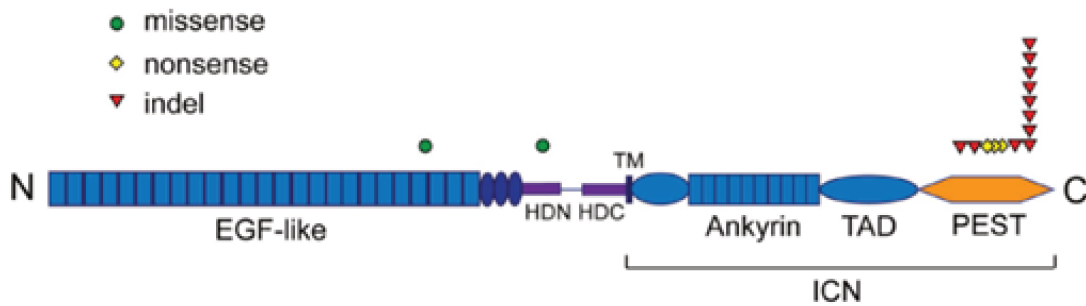


Figure 21. Distribution des mutations NOTCH1 observées dans le lymphome à cellules du manteau. ICN réfère au domaine intracellulaire de NOTCH1 composé de motifs ankyrin, de TAD, le domaine de transactivation et du domaine PEST ; HDN-N et HDN-C correspondent à la partie N-terminale et C-terminale du domaine d'hétérodimérisation respectivement ; et TM correspond au domaine transmembranaire. Cercle verts : mutations faux-sens ; losanges jaunes : mutations non-sens ; triangles rouges : indels (insertions/délétions). Adapté d'après (Kridel et al., 2012).

Il est rapporté, de plus, que les mutations tronquantes du domaine PEST augmentent la stabilité de la protéine NOTCH1 et de ce fait, l'activent de façon constitutive. D'ailleurs, ces mutations sont associées à une plus mauvaise survie globale ($p=.003$) chez ces patients, laissant suggérer alors un rôle pronostic du gène NOTCH1 dans le lymphome à cellules du manteau, bien que ceci n'ait jamais été montré de manière prospective dans une cohorte homogène de patients atteints de lymphomes à cellules du manteau (Kridel et al., 2012). (

Figure 22).

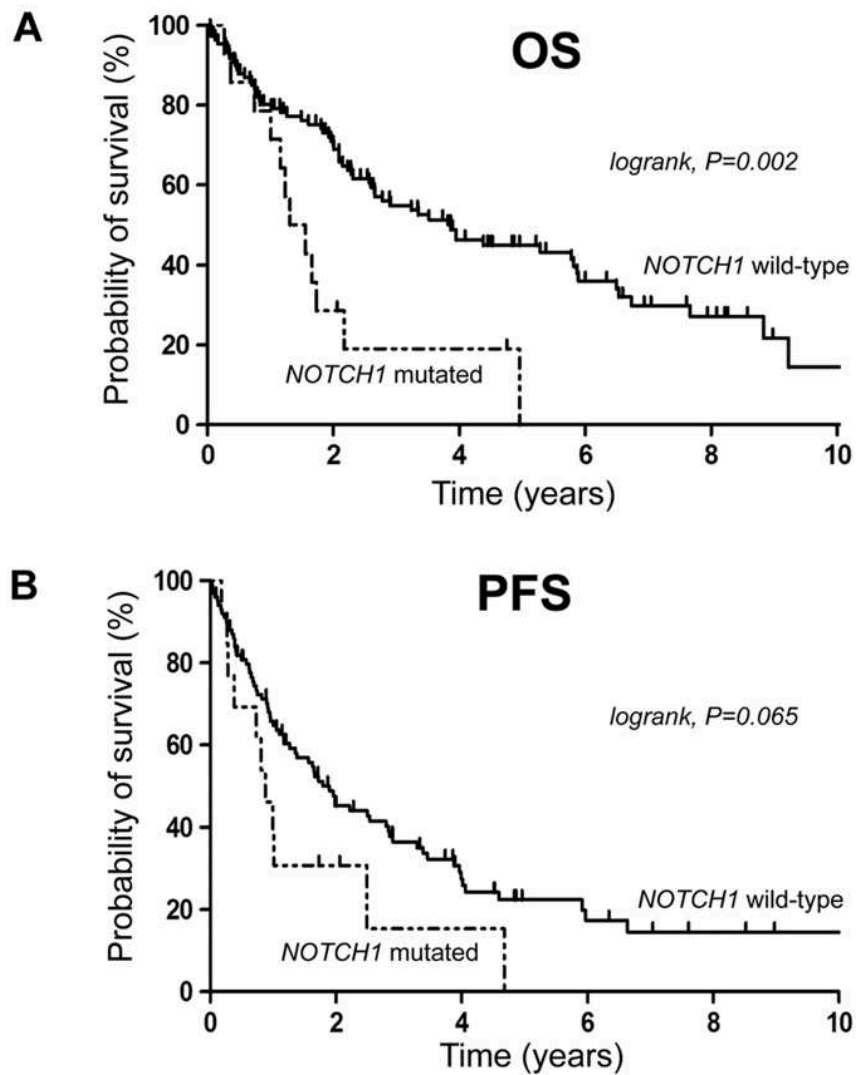


Figure 22. Les mutations NOTCH1 sont associées à un plus mauvais pronostic. Courbe de Kaplan-Meier pour l'estimation de (A) la survie globale médiane (OS) et (B) la survie sans progression (PFS).

Il est intéressant de noter que le profil et les fréquences des mutations NOTCH1 observés dans les travaux de Kridel et al sont très similaires à ceux récemment décrits dans la leucémie lymphoïde chronique. En effet, la délétion dinucléotidique en position 9:138510470-71 (P2514Rfs*4) retrouvée dans cette étude, dans 8 cas de lymphome à cellules du manteau, est également la plus commune des altérations du gène NOTCH1 dans la leucémie lymphoïde chronique (Fabbri et al., 2011; Puente et al., 2011).

ii. Mutation TP53

Physiologiquement, la protéine 53 (P53) est capable non seulement d'arrêter le cycle cellulaire mais aussi d'induire l'apoptose de cellules endommagées. P53 est également impliquée dans d'autres fonctions cellulaires cruciales telles que la sénescence cellulaire, la réparation de l'ADN et plus largement dans le métabolisme. Ces différents rôles de P53 en font un facteur suppresseur de tumeurs clé.

P53 est d'ailleurs très fréquemment muté ou inactivé dans près de 60% des cancers solides tels que le cancer du tractus gastro-intestinal, du poumon ou encore du sein et des ovaires entre autres (Cheung et al., 2009).

La prévalence des mutations TP53 (Protéine 53 Tumorale) dans les hémopathies malignes est, quant à elle, considérablement plus basse (<20%) (Cheung et al., 2009). Toutefois, ces mutations ont été reportées comme étant associées à un mauvais pronostic dans le lymphome diffus à grandes cellules B, la leucémie lymphoblastique chronique (Cheung et al., 2009) ainsi que dans le lymphome à cellules du manteau et dans la forme blastoïde (Cheung et al., 2009) ainsi que chez les patients jeunes traités par R-CHOP, Cytarabine et greffe autologue (Rossi et al., 2015).

De plus, des mutations TP53 ont été identifiées dans une étude dans 16/82 (20%) des cas de lymphome à cellules du manteau et ont été associées à un pronostic défavorable (Greiner et al., 2006). Le pronostic des délétions 17p (incluant le gène P53) dans cette maladie n'est pas aussi clair, bien que diverses études ont indiqué qu'il existait une corrélation entre ces délétions 17p et une plus faible survie globale chez ces patients (Rubio-Moscardo et al., 2005).

Plus récemment, le profil mutationnel et l'impact pronostic des mutations TP53 ont également été étudiés dans une cohorte de 119 cas de lymphome à cellules du manteau principalement issus de ganglions lymphatiques mais aussi de rates, amygdales et de moelles osseuses (84 formes classiques et 35 formes blastoïdes) par séquençage de Sanger (Halldorsdottir et al., 2011). Dans cette étude, 19 mutations TP53 ont été détectées (18/119 cas), (77% mutations faux-sens et 11% mutations non-sens) dont un cas avec une mutation silencieuse et un autre cas avec deux mutations TP53 (**Figure 23**).

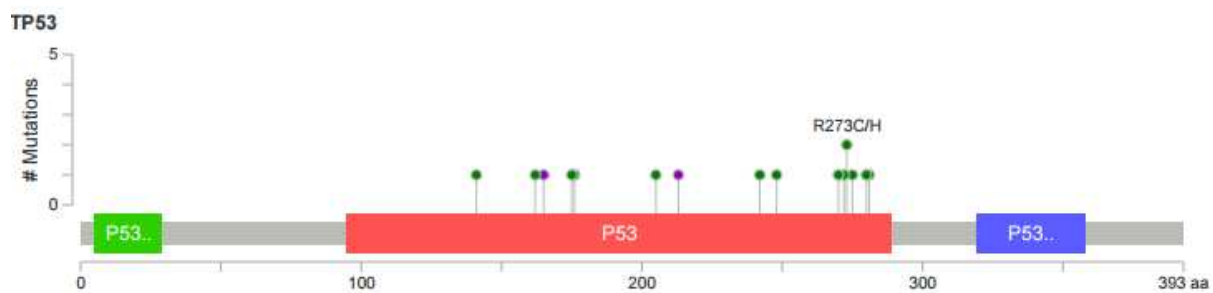


Figure 23. Distribution des mutations TP53 dans le lymphome à cellules du manteau. Les mutations TP53 affectent majoritairement le domaine de liaison à l'ADN (en rose) de la protéine P53 (exons 4-8) dans lequel plus de 90% des mutations TP53 sont reportées dans les cancers. Domaine vert : domaine de transactivation ; domaine bleu : domaine de tétramérisation. Cercles verts : mutations faux-sens ; cercles violets : mutations non-sens (Halldorsdottir et al., 2011).

Ce profil mutationnel est similaire à celui reporté dans la base de données IARC (base de données sur l'épidémiologie des cancers) qui répertorie 26608 mutations TP53 dans les cancers. De plus, aucune corrélation entre la fréquence des mutations TP53 et l'histologie des tumeurs n'a pu être établie ($p=0.6$, test de Fisher). Néanmoins, il est intéressant de noter que les variants blastoïdes ont une médiane de survie globale plus courte que les variants classiques (24 vs 39 mois, $P=0.01$, test log rank) (Li et al., 2011). Quant à la présence ou l'absence des délétions 17p, elle n'influence pas de façon significative la survie globale des patients de cette cohorte (survie globale médiane, 39 mois vs 35 mois, respectivement ; $p=0.7$) (**Figure 24**).

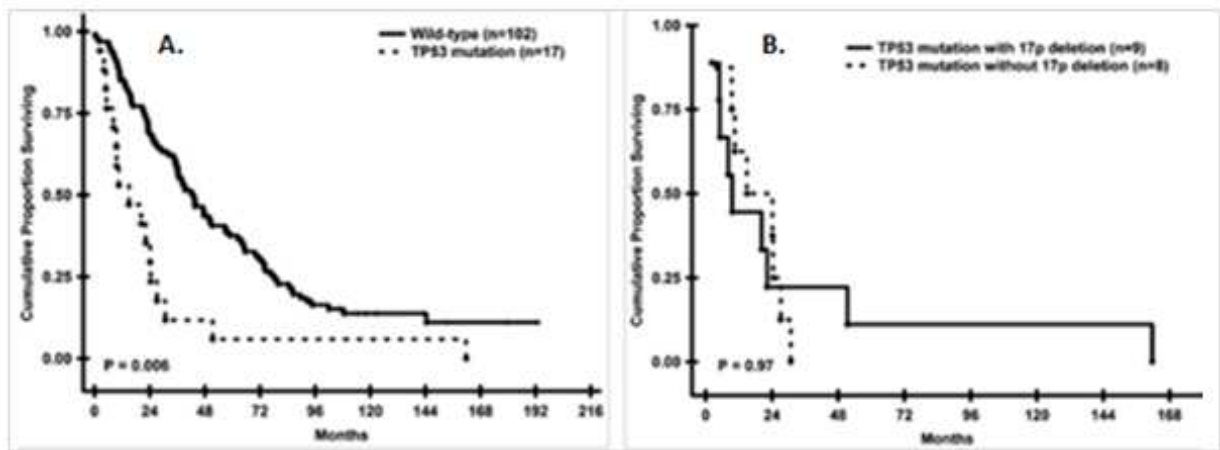


Figure 24. Courbes de survie de 119 cas de lymphomes à cellules du manteau. (A) en relation avec le statut mutationnel de TP53 (muté n= 17 vs non-muté n=102). (B) au sein des 17 patients présentant des mutations TP53 avec délétion 17p (n=9) et sans délétion 17p (n=8). *Adapté d'après* (Halldorsdottir et al., 2011)

3.5 Mutations génétiques affectant le microenvironnement cellulaire – Cas de l'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est essentielle à d'autres fonctions cellulaires telles que la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose et donc plus généralement dans la transformation cellulaire. Des études récentes ont d'ailleurs rapporté des mutations au sein de facteurs protéiques impliqués dans l'adhérence cellulaire tels que les cadhérines ou encore les caténines qui leur sont associées. En effet, Zhang et al., a décrit 2 mutations (3.6%) au sein de CDH8 et 5 mutations (9%) au sein de FAT4 ainsi que 3 mutations (5%) au sein de CTNNA2 sur 56 cas de lymphomes à cellules du manteau séquencés par WES. Les mutations CDH8 ont également été décrites par Beà et al., dans un cas sur 29 patients (3.4%) atteints de lymphome à cellules du manteau. Bien que ces mutations soient de faible fréquence, il est intéressant de les rapporter car ces facteurs interagissent avec d'autres facteurs d'impact pronostique plus importants tels que NOTCH1 (Zhang et al., 2014).

3.6 Impact des mutations au sein de régulateurs épigénétiques sur l'organisation de l'épigénome dans le lymphome à cellules du manteau

Le développement normal et la différenciation cellulaire sont sous le contrôle d'une régulation génétique et épigénétique fine. En effet, l'activation des gènes mais aussi la répression génique dépendante de l'état hétérochromatinien sont à la base de ces processus.

L'hétérochromatine est un compartiment spécialisé dans lequel la chromatine est établie et maintenue par des enzymes telles que les ADN méthyltransférases et les histones méthyltransférases, responsables de modifications chimiques spécifiques de l'ADN (méthylation de l'ADN) et des histones (méthylation de l'histone H3 au niveau des lysines 9 et 27 : H3K9me3 et H3K27me3, respectivement). Ces modifications constituent un code épigénétique combinatoire unique permettant le recrutement de facteurs hétérochromatiniens clés comme HP1 (Heterochromatin Protein 1), assurant l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine au fil des divisions cellulaires.

L'organisation topologique de l'hétérochromatine dans le noyau apparaît comme étant également importante pour le contrôle de la répression génique. Ainsi, les perturbations au niveau de l'hétérochromatine (gain ou perte) sont de plus en plus décrites dans les cancers, incluant les lymphomes (Fournier et al., 2010).

Des perturbations épigénétiques telles que des modifications d'histones affectant la structure de la chromatine ou encore des perturbations au niveau la méthylation de l'ADN ont également été reconnues comme des éléments clés dans la transformation et la progression tumorale. Une étude très récente a d'ailleurs effectué une analyse épigénomique détaillée du lymphome à cellules du manteau dans le contexte du programme complet de différenciation de la cellule B normale. Ces travaux ont d'ailleurs démontré que les profils de méthylation de l'ADN durant la lymphomagenèse sont largement influencés par la dynamique de méthylation dans les cellules B normales (Queiros, Cancer cell, 2016). De plus, il a été montré que 10,504 régions sont méthylées de façon différente dans des éléments régulateurs marqués par la marque H3K27 acétylé dans des tumeurs primaires de lymphome à cellules du manteau, incluant notamment un « enhancer » formant de nouvelles boucles dans l'oncogène SOX11 (Queiros, Cancer cell, 2016).

Dans ce contexte, le NGS a permis de révéler que plus de la moitié des cancers arborent des mutations au sein d'enzymes impliquées dans l'organisation de la chromatine (Jones et al., 2016). Le développement actuel de nombreuses stratégies thérapeutiques en oncologie et plus particulièrement en onco-hématologie, basées sur des drogues dites « épigénétiques » tels que les agents déméthylants (DNMTi), les inhibiteurs des histones déacétylases (HDACi) et plus récemment les inhibiteurs iBET (Bromodomain and extra-terminal) renforce l'intérêt de caractériser ces dérégulations. Ces drogues, surnommées « broad reprogrammers » tentent d'opérer des changements à large échelle dans l'expression génique (Bhadury et al., 2014; Yang et al., 2014).

Ainsi, des mutations somatiques affectant les gènes codant pour des régulateurs épigénétiques clés ont été récemment décrites dans le lymphome à cellules du manteau. Par exemple, Meissner et al., a décrit les mutations au sein de l'hélicase CHD2 dans (3% ; 3/102 cas) par réséquençage ciblé de l'ADN (capture). CHD2 se lie spécifiquement au promoteur du gène MYOD1 (myogenic differentiation 1) conduisant au remodelage de la chromatine et conduisant à l'incorporation de l'histone H3.3.

Plusieurs études ont décrit des mutations au sein de MLL2 (mixed lineage leukemia) (KMT2D) et MLL3 (KMT2C), des histones H3K4 méthyltransférases. Cette famille MLL lie directement l'ADN et active la transcription génique (la marque H3K4me étant associée à l'activation de la transcription). MLL, l'homologue humain du gène trithorax chez la drosophile, régule d'ailleurs particulièrement l'expression des gènes HOX (homeobox). MLL est exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules hématopoïétiques incluant les cellules souches et les progéniteurs. De façon intéressante, des réarrangements de MLL sont associés au caractère agressif des leucémies aiguës lymphoïdes et myéloïdes chez les adultes comme chez les enfants. 10% environ des leucémies aiguës arborent des translocations MLL (Muntean and Hess, 2012). De plus, il a été montré que MLL2 est fréquemment muté dans le lymphome folliculaire (89%) et les lymphomes B diffus à grandes cellules (32%), les deux formes les plus communes de lymphomes non-Hodgkinien (Morin et al., 2011).

Des études récentes ont également décrit le rôle oncogénique des mutations MLL2 dans le lymphome à cellules du manteau. En effet, il a été montré le lien entre les mutations MLL2 et la perturbation de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs contrôlant certaines voies d'activation des cellules B (Ortega-Molina A et al., Nat Med, 2015). De même, il a été démontré que MLL2 peut également jouer un rôle de suppresseur de tumeur

lui-même et sa perte précoce pourrait promouvoir la lymphomagenèse par remodelage du paysage épigénétique dans les cellules cancéreuses précoces (Zhang J et al., Nat Med, 2015). La suppression des cellules mutées pour MLL2 pourrait donc représenter une approche thérapeutique intéressante ciblant les événements tumorigènes précoces.

Dans ce contexte, l'équipe d'E. Campo a identifié des mutations MLL2 (13.8% ; 4/29 cas) dans des échantillons tumoraux issus de sang périphérique (au diagnostic ou après traitement), de ganglions lymphatiques ou des amygdales prélevés au moment du diagnostic et uniquement dans des cas SOX11⁺ de lymphome à cellules du manteau (Beà et al., PNAS, 2013). Il est intéressant de noter que ces mutations sont identiques à celles identifiées dans les lymphomes diffus à larges cellules B et les lymphomes folliculaires (Morin et al., 2011).

De plus, Zhang et al., a confirmé la présence de mutations MLL2 dans (19,6% ; 11/56 cas) et uniquement dans des échantillons tumoraux issus de ganglions lymphatiques de lymphome à cellules du manteau. De même, les mutations MLL3 ont été décrites par Zhang et al., (16% ; 9/56 cas ; 1 masse axillaire et 8 ganglions lymphatiques) et par Rahal et al., (16% ; 27/165). Les mutations MLL2 et MLL3 n'étant pas mutuellement exclusives.

Des mutations au sein du facteur de transcription MEF2B, connu pour fonctionner comme un régulateur de la chromatine, ont été récemment décrites dans le lymphome à cellules du manteau par WES et séquençage Sanger par Beà et al., (3.2% ; 6/187cas) et uniquement dans des cas SOX11⁺ et par Meissner et al., (6.8% ; 6/187 cas) par séquençage ciblé. Des mutations récurrentes au sein de ce gène ont également été décrites dans des cas de lymphome diffus à larges cellules B (Morin et al., 2011). Il a été rapporté, d'ailleurs, que la forme mutée de la protéine MEF2B pourrait conduire à la dérégulation de l'expression du proto-oncogène BCL6 (B-cell CLL/lymphoma 6) dans cette maladie (Ying et al., 2013).

Enfin, d'autres mutations au sein de WHSC1 (également nommé MMSET ou NSD2), une méthyltransférase de l'histone H3K36, ont été décrites pour la première fois dans les lymphomes dans Beà et al., (10% ; 13/130) par WES et séquençage Sanger. Ces mutations affectent le domaine fonctionnel SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax) directement impliqué dans la méthylation de H3K36. De façon intéressante, le gène WHSC1

est la cible de la translocation IGH t(4 ;14) dans le myélome à cellules plasmocytaires, dans lequel il est surexprimé et associé à une augmentation de la méthylation de H3K36 et une diminution de la méthylation de H3K27 à travers le génome (Martinez-Garcia E et al., Blood, 2011). Les cas de lymphomes à cellules du manteau dans lesquels WHSC1 est muté, montrent une surexpression significative des signatures de gènes surexprimés dans le myélome à cellules plasmocytaires (Zhan et al., 2007).

Ainsi, de nouvelles mutations génétiques impactant des voies de signalisation majeures ainsi que des régulateurs épigénétiques ont récemment été identifiées. Actuellement, l'impact pronostique de ces mutations n'a pas été évalué dans des études prospectives de cohortes de patients atteints de lymphome à cellules manteau, traités de façon homogène. De plus, l'impact fonctionnel de ces mutations génétiques sur les régulateurs épigénétiques n'a pas été établi.

Dans ce contexte, il paraît intéressant d'utiliser le NGS ciblé en tant qu'outil diagnostique, prédictif et pronostique dans le suivi des patients atteints de lymphome à cellules du manteau mais également comme un moyen de découvrir de nouveaux circuits génétiques et épigénétiques d'intérêt pour la mise en place de thérapies ciblées pour cette maladie. Cet aspect n'ayant, jusqu'à présent, pas été appréhendé dans les travaux publiés à ce jour.

Arguments scientifiques

Les lymphomes à cellules du manteau sont des lymphomes B diffus à petites cellules représentant 5% des lymphomes non Hodgkiniens (Jares et al., 2007) avec une médiane de survie 4-5 ans (Herrmann et al., 2009). Ils résultent de la prolifération anormale de lymphocytes B matures présents normalement au niveau de la zone du manteau des follicules lymphoïdes. Cette maladie survient principalement chez les sujets âgés (âge médian : 68 ans) et de façon prédominante chez les hommes (rapport M/F : 4 :1). La prévalence est estimée à 1 individu sur 25 000 et l'incidence est de 3 cas pour 100 000 individus par an, en France. Biologiquement, le lymphome à cellules du manteau est caractérisé par un immunophénotypage bien particulier : CD19⁺, CD20⁺, CD5⁺, CD23⁻ et CD10⁻. Les marqueurs CD19 et CD20 étant impliqués dans la régulation du développement, de l'activation et de la différenciation des lymphocytes B. Le CD5, quant à lui, joue un rôle de régulateur négatif de la signalisation issue du BCR.

Les cellules tumorales du lymphome à cellules du manteau sont caractérisées par la translocation t(11;14)(q13;q32) responsable du positionnement du gène codant la cycline D1 sous le contrôle du promoteur des chaînes lourdes des immunoglobulines (Jares et al., 2012). Ceci conduit à la surexpression constitutive de la cycline D1 et à des dérégulations du cycle cellulaire. Outre ses fonctions dans le cycle cellulaire, la cycline D1 peut être impliquée dans la régulation de certains facteurs de transcription et dans des processus de réparation de l'ADN au sein de la cellule mais cet aspect est pour le moment moins étudié. Cependant, d'autres événements oncogéniques doivent être impliqués dans le développement des lymphomes à cellules du manteau étant donné que les souris transgéniques dans lesquelles la cycline D1 a été surexprimée ne développent pas pour autant de lymphomes à cellules du manteau (Katz et al., 2014).

Actuellement, les stratégies cliniques proposées pour le traitement du lymphome à cellules du manteau sont très diverses et sont appliquées en fonction de l'âge du patient mais aussi de ses signes de comorbidité. Parmi elles, par exemple, les chimiothérapies à base de Cytarabine mais aussi l'utilisation du Rituximab, un anticorps monoclonal, associé à une polychimiothérapie (Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone) sont les traitements les plus utilisés en combinaison avec des greffes de cellules souches hématopoïétiques (autogreffes ou allogreffes selon les cas). Cette diversité thérapeutique

souligne bien le fait que le lymphome à cellules du manteau est une maladie difficile à traiter de par son hétérogénéité biologique et son agressivité. En effet, la progression de la maladie, les résistances aux traitements ainsi que les rechutes fréquentes constituent actuellement un challenge pour les cliniciens et requièrent urgemment la mise en place de thérapies et d'outils pronostiques alternatifs.

L'émergence de nouvelles techniques de séquençage à haut débit telles que le séquençage nouvelle génération (NGS) permet d'identifier de manière globale les perturbations génétiques chez les patients et révolutionnent ainsi de plus en plus le domaine de la génétique, que ce soit par des approches sur génome ou transcriptome entier mais aussi des analyses plus ciblées du génome (régions, exons etc.).

Grâce à ce débit d'analyse, le NGS permet d'identifier ces mutations génétiques d'une pathologie et apporte non seulement des connaissances d'aspect général sur complexité génomique (Mardis and Wilson, 2009; Villamor et al., 2013) mais surtout pourrait améliorer la prise en charge des malades atteints de cancer en rendant possible de prédire l'évolution de la maladie et d'adapter les traitements en vue d'une meilleure réponse thérapeutique.

Comme nous l'avons vu, le NGS a d'ores et déjà permis la découverte récente de nouvelles mutations dans les lymphomes à cellules du manteau comme les mutations au sein du gène NOTCH1 (14%) associées à un mauvais pronostic bien que ceci n'ai pas été démontré dans d'autres séries de lymphomes à cellules du manteau (Kridel et al., Blood, 2012). Des mutations ont également été identifiées de façon récurrente au sein de MEF2B (myocyte enhancer factor 2B), TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) et TET2 (methylcytosine dioxygenase) (Meissner et al., 2013). De façon tout à fait surprenante, le gène UBR5 (ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5) est le troisième gène comportant le plus de mutations (18%) et est corrélée à un mauvais pronostic dans un sous-groupe de patients atteints de lymphomes à cellules du manteau (Meissner et al., 2013).

Parallèlement, 25 gènes significativement mutés de façon récurrente dans le lymphome à cellules du manteau ont été identifiés par l'équipe d' E. Campo, les plus fréquemment mutés étant ceux codant pour les protéines ataxia telangiectasia mutée ATM (41.4% ; 12/29), la cycline D1 (34.5% ; 10/29), le suppresseur de tumeur TP53 (31% ; 8/29), les méthyltransférases MLL2 (14% ; 4/29) et WHSC1 (14% ; 4/29), l'ubiquitine ligase BIRC3

(6% ; 3/29), le facteur de transcription MEF2B (3% ; 2/29) et le récepteur de type Toll, TLR2 (1% ; 2/29). D'autres mutations, plus rares (<1%), sont également décrites comme par exemple, les mutations au sein du gène codant le facteur de transcription LUZP4 (Leucine Zipper Protein 4), l'enzyme DCP1B (mRNA-decapping enzyme 1B) et la protéine SP140 (nuclear body protein) (Bea et al., 2013).

Récemment, l'implication de mutations au sein de gènes codant pour des facteurs impliqués dans la voie NFκB a été décrite, influençant la réponse à l'Ibrutinib et à la Sotrastaurine (Rahal et al., 2014).

Enfin, Zhang et al., a décrit de nouvelles mutations au sein des gènes codant le régulateur chromatinien SMARCA4 (14.2% ; 8/56), les suppresseurs de tumeurs RB1 (10.7% ; 6/56) et DLC1 (9% ; 5/56), les cadhérines FAT4 (9% ; 5/56) et CDH8 (3.5% ; 2/56), les facteurs de transcriptions SALL3 (9% ; 5/56), ZNF296 (7.1% ; 4/56), ZNF117 (5.4% ; 3/56) et ESX1 (5.4% ; 3/56), de la protéine POT1 (5.4% ; 3/56) impliquée dans la protection des télomères, de la kinase EIF2AK4 (5.4% ; 3/56), de la caténine CTNNA2 (5.4% ; 3/56), de la deshydrogénase OGDHL (5.4% ; 3/56) et de l'ATPase ATP11C (3.5% ; 2/56) (Zhang et al., 2014).

Dans ce contexte, ce travail de thèse a eu pour but de développer un panel de NGS ciblant les gènes décrits comme associés au lymphome à cellules du manteau.

Pour ce faire, une étude bibliographique approfondie des articles de références dans le domaine de la génétique du lymphome à cellules du manteau publiés entre 2012 et 2015 a été réalisée, afin de recenser minutieusement les échantillons, les techniques et les gènes dans lesquels des mutations ont été identifiées dans le lymphome à cellules du manteau. Suite à ce travail, un panel personnalisé criblant 44 gènes d'intérêt (354 exons) pour le lymphome à cellules du manteau a été créé (99.94 kb, 999 amplicons, 94,73% couverture), permettant d'identifier ces mutations somatiques génétiques et d'établir des corrélations avec les informations cliniques et biologiques des patients. Un axe épigénétique (CHD2, MLL2, MLL3, SMARCA4, TET2 et WHSC1) particulier a également été donné à ce panel, s'inscrivant dans les problématiques développées par notre équipe, afin de mieux caractériser l'impact de mutations affectant ces régulateurs épigénétiques. Deux autres gènes cibles : MYD88 (myeloid differentiation primary response 88) et SF3B1 (splicing factor 3b subunit 1) ont également été intégrés afin de permettre l'utilisation de ce panel pour des diagnostics

différentiels à savoir respectivement la maladie de Waldenström, les lymphomes de la zone marginale et la leucémie lymphoïde chronique, ainsi que BTK pour pouvoir étudier la résistance aux inhibiteurs de BTK.

Dans un second temps, le séquençage de 30 patients (plus de 38 échantillons) atteints de lymphome à cellules du manteau et 6 lignées cellulaires dérivées de lymphome à cellules du manteau a été réalisé par notre équipe et grâce aux ressources biologiques disponibles (échantillons ADN issus de sang, moelle ou ganglion lymphatique) en lien avec des essais cliniques coordonnés par notre équipe et conduits au CHU-Grenoble. En parallèle, un travail de mise en place d'une stratégie d'analyse des données de séquençage a été développée afin d'identifier les variants somatiques et les corrélés ainsi aux données biologiques et cliniques des patients.

En résumé, ce travail de thèse a permis, non seulement, la mise en place d'un outil NGS à travers le développement d'un panel personnalisé de gènes clés dans la pathogenèse du lymphome à cellules du manteau permettant l'analyse du paysage mutationnel mais aussi d'évaluer le rôle du NGS en tant qu'outil prédictif, diagnostique et pronostique dans la prise en charge des patients atteints de lymphomes à cellules du manteau.

Résultats

Assessment of a targeted deep sequencing gene panel as a precision medicine tool in mantle cell lymphoma

Sarah Bertrand¹, Azadeh Hajmirza¹, Arnaud Gauthier¹, Céline Suchaud-Martin², Samuel Duley¹, Isabelle Putaud², Martine Chauvet^{1,2}, Sieme Hamaidia^{1,2}, Cedric Arisdakessian¹, Amandine Chatagnon², Nicolas Thierry-Mieg³, Christine Lefebvre^{1,2}, Marie-Christine Jacob^{1,2}, Thierry Bonnefoix^{1,4}, Steven Le Gouill⁵, Remy Gressin^{1,6*}, Anouk Emadali^{1,4*}, Mary Callanan^{1,2*}

¹ INSERM Unit 1209 and CNRS UMR 5309 and Faculté de Médecine, Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, Institute for Advanced Biosciences, 38706 Grenoble, France

² Institut de biologie et de pathologie, CHU de Grenoble-Alpes

³ CNRS UMR 5525, TIMC- IMAG/BCM, Faculté de Médecine, Université Grenoble Alpes, 38706 La Tronche Cedex, France

⁴ Pôle Recherche, CHU de Grenoble-Alpes, Grenoble, France

⁵ Service d'Hématologie Clinique, CHU de Nantes, Nantes, France

⁶ Service d'Hématologie Clinique, CHU de Grenoble-Alpes, Grenoble, France

Correspondence:

Mary Callanan

E-mail: mary.callanan@univ-grenoble-alpes.fr

Anouk Emadali

E mail : anouk.emadali@univ-grenoble-alpes.fr

Rémy Gressin

E-mail RGressin@chu-grenoble.fr

Centre de Recherche – INSERM Unité 1209-CNRS UMR 5309 - Faculté de Médecine,
Université Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, Site Santé, IAB, BP 170 - La
Tronche, 38042 GRENOBLE Cedex 9 – France.

Tel: +33 (0)4 76 54 95 84 ; Fax: +33 (0)4 76 54 94 25

ABSTRACT

Mantle cell lymphoma (MCL) is a clinically aggressive disease for which molecular profiling-based precision medicine algorithms are lacking. Here, to address this issue we have designed and implemented a targeted deep sequencing gene panel covering 44 recurrently mutated genes in MCL. By studying a cohort of 30 patients (38 samples), we demonstrate the feasibility of our gene sequencing assay for defining mutation profiles from very small DNA quantities, in time frames compatible with clinical decision-making in MCL. Mutation frequencies largely comply with published cohorts of similar size. By studying a subgroup of refractory compared to long term remission patients who were enrolled in a LYSA phase II RiBVD (Rituximab, Bendamustine, Velcade and Dexamethasone) we identify mutations in *TP53*, *MLL2*, and *MEF2B* as characteristic of primary refractory disease. *TP53* mutation screening by targeted deep sequencing in a further 63 MCL cases (in the clonally involved blood samples and / or bone marrow) showed very short survival for *TP53* mutant cases compared to wildtype case. Gene expression profiling followed by unbiased functional annotation in *TP53* wildtype versus mutant MCL point to reduced cytotoxic immune function and gain of NF κ B and a MYC-regulated core stem cell pathways, respectively, as potentially important biological processes underpinning *TP53*-driven treatment failure in MCL. Thus implementation of our targeted deep-sequencing gene panel is feasible and presents clear potential as a useful companion precision medicine tool for MCL patient management, and for discovery of novel disease mechanisms.

INTRODUCTION

Mantle Cell Lymphoma (MCL) represents about 5% of non-Hodgkin lymphoma and is a clinically aggressive disease characterized by iterative clinical relapses that are increasingly difficult to treat by successive salvage therapies (4-5 years as median overall survival). Some patients do however survive greater than 10 years after initial diagnosis (1). There is thus considerable interest in defining molecular markers to guide precision medicine approaches in the care of patients with mantle cell lymphoma.

Biologically, MCL is characterized by clonal expansion of malignant B cells that show a distinctive immunophenotype (CD5+, CD10-, CD23-) and that harbor the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32) which drives illegitimate expression of the G1 cyclin gene, *CCND1*. Numerous additional copy number gains or losses mostly affecting cell cycle regulatory and proliferation genes or genes encoding DNA repair factors (ATM, TP53) (2, 3). More recently, whole genome / exome and RNA sequencing efforts have revealed complex patterns of gene mutations affecting known and novel gene targets in MCL. These mutations target numerous proteins including *CCND1* itself, transcription factors (MEF2B and NOTCH1/2), members of the TRAF3/MAP3K14-TRAF2/BIRC3-negative regulatory complex of noncanonical NF- κ B signaling, ubiquitin signaling factors (UBR5) and epigenetic modifiers such as MLL2, MLL3 and TET2 (4-8).

A characteristic of the mutational landscapes described thus far in MCL is the relatively low frequency of individual gene mutations across the studied patient cohorts (many mutations are observed in ~10 % or less of patients) (4-8). Of the genes identified none can be considered as specific to MCL and information concerning the clinical pertinence of the described mutations is lacking. In this context we set out to design, implement and test a targeted deep sequencing gene panel for use in the clinical setting in MCL. We demonstrate the feasibility of this gene panel for defining mutational signatures in MCL at diagnosis, during disease progression / relapse after bone marrow transplantation (BMT) or in *de novo* treatment refractory MCL.

MATERIALS AND METHODS

MCL patient samples

MCL patients were recruited retrospectively between 1997 and 2016 through the Grenoble University Hospital lymphoma bank or were selected for analysis from the LYSA tumour bank for the RiBVD phase II trial, coordinated by the French Lymphoma Study Association (LYSA). Following review of clinical and biological criteria for MCL diagnosis, and on the basis of available histologic data, DNA and RNA samples and access to clinical and cytogenetic data, 30 patients were enrolled in the initial MCL gene panel testing phase (Table S2). A further 65 patients underwent targeted deep sequencing of the entire *TP53* locus. All patients provided written informed consent. The study was approved by Grenoble Hospital institutional review board and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Genomic DNA from MCL patients and healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were extracted using standard procedures, as described.

MCL cell lines

The human MCL-derived cell lines (Hbl-2, Jeko-1, JVM-2, Maver-1, Mino and Rec-1) were grown in RPMI 1640 and 25mM HEPES (Gibco), supplemented with 2mM L-glutamine (Gibco) and 100µg/ml Penicillin/Streptomycin solutions (Gibco) and 10% (Hbl-2, JVM-2 and Rec-1) or 20% (Jeko-1, Maver-1, Mino) of fetal bovine serum (FBS) (Biowest). Hbl-2 was also supplemented with 1mM sodium pyruvate (Gibco), non-essential amino acids (Gibco) and vitamins (Gibco). Granta-519 cells were grown in DMEM and 25mM HEPES (Gibco), supplemented with 10% FBS (Biowest), 4.5g/L glucose (Gibco) and 100µg/ml Penicillin/Streptomycin solutions (Gibco).

Targeted deep sequencing gene panel for MCL

The chosen sequencing platform was the Ion Torrent PGM, using Ampliseq library sequencing. For MCL target gene selection, 6 massively parallel sequencing studies (totalling 574 patients) (Table S1) were curated to identify recurring gene mutations in MCL. By applying frequency criteria (10%) and by using manual inspection of the COSMIC data base, a list of 45 genes that showed recurrent mutation in MCL and / or potential biological significance for MCL pathogenesis were selected for the design of Ampliseq sequencing library primers by using the Ampliseq Designer software. The target sequencing depth was 500X. The gene sequencing assay primers were thus pooled in two tubes. Design was optimized so that known mutation hotspot clusters localized where possible to the central region of amplicons. The resulting MCL custom AmpliSeq gene covered a total size of 99.94 kb and included 999 amplicons targeting 341 (mostly exonic) regions from 44 of the 47 selected genes (Table S3, for *NOTCH1/2* and *hTERT* promoter region, the Ampliseq design failed). The overall theoretical coverage rate was 94.73% although certain sites [*ATM* exon 49 (L2427); *ESX1* exon 4 (P323T, R329P, G369R); *TLR2* exon 3 (S298Y); *ZNF296* exon 3 (S189*, E190K)] could not be covered by sequencing amplicons. *NOTCH1* mutations were scored manually using Sanger sequencing. *hTERT* and *NOTCH2* mutation screening was not performed in this study. An additional 3 genes of interest for differential or comparative diagnosis with other small lymphocytic lymphoma (*MYD88*) or B-cell chronic lymphocytic leukemia (*SF3B1*) or resistance to BTK inhibitors (BTK) were also included.

Targeted gene panel and Sanger sequencing

Ion Ampliseq DNA libraries were prepared using 2 x 10 ng of genomic DNA (for a list of the cases studied and the tissue source of DNA, see Table S2) in two reactions using primers pools of 504 and 495 amplicon primer pairs respectively. Libraries were submitted to emulsion polymerase chain reaction (PCR) with the Ion PGM Hi-Q OneTouch 2 template kit v2. The generated ion sphere particles were enriched with the Ion OneTouch Enrichment

System, loaded, and sequenced with the Ion PGM Hi-Q Sequencing 200 Kit on Ion 316 v2 chips (Thermo Fisher Scientific). Torrent Suite version 5.0 software (Thermo Fisher Scientific) was used to perform primary analysis, including signal processing, base calling, sequence alignment to the reference genome (hg19), and generation of binary alignment/map files. Binary alignment/map files were used by Torrent Suite Variant Caller to detect point mutations and short indels using the PGM Somatic Low Stringency profile. Variant Call Format files generated by Variant Caller were annotated using Variant Effect Predictor. Samples were considered of sufficient quality when >90% of targeted bases were read with a base call accuracy of at least Q20. The average sequencing depth was 471X. Variants present in single nucleotide polymorphism databases and absent in COSMIC (version 64) were discarded, as were variants with a predictive SIFT (sorting intolerant from tolerant) score >0.05. DNA libraries were generated using Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher) according to manufacturer's recommendations. Likewise variants that were detected in the normal control pooled DNA were flagged as artefact false positives and subtracted from the final somatic variant list in MCL lines and clinical samples. Sanger sequencing of the *NOTCH1* locus was performed by standard methods using primers and PCR conditions, as described (5). Purified PCR products were directly sequenced in both directions, using BigDye Terminator Mix (Applied Biosystems), on the Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer. Data were analyzed with the SeqScanner software version 1.0 (Applied Biosystems).

Gene expression profiling

Affymetrix GEP was performed as described previously by using total RNA and Affymetrix U133 2.0 chips. GEP data normalization and gene set enrichment analysis (GSEA) were performed as described previously (9).

Statistical methods

Excel 2010 (Microsoft), JMP 10.0.0 (SAS Institute), Stata/IC 10.1 (StataCorp), and GraphPad (Prism) software programs were used for graphical representations and to perform statistical analysis across all experiments. Survival curves were built according to the Kaplan-Meier method. Comparison of Kaplan-Meier survival estimates was performed using the log-rank test. Univariate and multivariate survival analyses were performed using Cox proportional hazards regression to identify statistically significant predictors of overall survival and to obtain hazard ratio estimates as well as corresponding 95% confidence intervals.

RESULTS

Implementation and testing of the targeting deep-sequencing gene panel for MCL

As a first step to testing our MCL gene panel, we performed targeted deep sequencing in 6 MCL cell lines (Granta 519, Hbl, Jeko-1, Maver-1, Mino, Rec-1) compared to a pool of 5 normal donor PBMC samples, in two independent sequencing runs. This showed high quality, reproducible sequence reads, at acceptable sequencing depth for the majority of target amplicons. Importantly the expected mutation profiles for the MCL cell lines tested were observed (Fig.1B). These were *ATM* mutations in Granta, Mino and Rec-1, as expected and *TP53* mutations in all cell lines except Granta. Additional mutations were in the *RB1* (Jeko-1), *SMARCA4* (Maver-1), *MLL3* (Jeko-1), and *MEF2B* genes (Rec-1), as described in published series (Fig. 1B, left panel and Table S2) (5, 8). We next screened 22 primary MCL cases treated at our center (including respectively, 18 classical, 3 pleomorphic, 1 blastoid variant case, and 1 case of in situ mantle cell neoplasia (ISMCN) (formerly, MCL in situ) (10). Of these 22 cases, 17 (77%) showed at least 1 somatically gene (range 1 to 3 mutations, per case) (Fig. 1B). Three cases (1 case each of classical, ISMCN and pleomorphic variant MCL, respectively) showed no mutations in any of the genes tested, despite having proven high tumor cell content and / or simple or complex karyotypes showing the t(11;14)(q11;q32) (Fig.

1B, and data not shown). In contrast, one case of classical variant MCL (VER Pi) with an isolated t(11;14)(q13,q32) showed mutations in 3 genes (*CCND1*, *RB1* and *CHD2*, respectively).

As expected from published reports, *ATM*, encoding the ataxia-telangiectasia mutated kinase, involved in DNA double strand break and replicative stress responses, was the most frequently mutated gene in our series (over 50% of cases). Mutations occurred throughout the gene, except that no mutations were observed in the regulatory FAT (named after FRAP-ATM-TRRAP) domain of the ATM kinase, which is in contrast to published series (Fig. S1A). TP53 mutations were identified in approximately 10% of our cases (3/22), again as expected.

CCND1 mutations were more frequent in our series (20% of cases compared to approximately 10% in published series, Table S1) and occurred predominantly MCL patients with pleomorphic variant (2 of 3 *CCND1*-mutated cases) in our series. *CCND1* mutations were associated with *ATM*, *TP53*, *RB1*, *LUZP4* or *CDH2* mutations singly or in combination but were not observed with mutations in genes from other functional classes (epigenetic regulation - with the exception of *CDH2* which encodes chromodomain helicase 2 – ubiquitin or NFkB signaling).

Mutations affecting chromatin modifier genes were observed in 7/22 cases with mutations in the *SMARCA4*, *WHSC1* and *MLL2* genes being observed in association with *ATM* mutations while *MLL3* and *CHD2* mutations were seen in the absence of *ATM* mutations.

Interestingly, one MCL case (BOC Ja, diagnosed with blastoid variant MCL) displayed a KLF2 p.S287W missense mutation (VAF 58%). Although KLF2 mutations have been described in splenic marginal zone B cell lymphoma (SMZL) and in rare MCL cases, their pathological role outside of SMZL is not well understood. The mutation observed here is novel in MCL. In reporter assays, it has been shown to be loss of function mutation that affects a highly conserved serine residue in the KLF2 ZF1 domain and that results in uncontrolled NFkB signaling (11).

Gene panel-based mutation profiling identifies a central role for TP53 and epigenetic modifiers in relapsing and treatment refractory MCL.

We next wished to establish the utility of our targeted deep sequencing gene panel for the detection of treatment resistance mutations in MCL. For this we selected 5 MCL cases who either relapsed (2) or showed primary refractory (3) disease in the immuno-chemotherapy setting, and for which DNA for at least one sample at the time of treatment resistance was available for analysis. In 2 of these 5 MCL cases, sequential samples were available for gene panel sequencing prior to initial therapy and upon relapse from subsequent salvage therapies post BMT transplantation (Fig. 2A, left and right panels, respectively; BER Ra and FRA Mi). In the first case (BER Ra) lymph node-derived tumor DNA samples obtained prior to and at the time of relapse 9 years after autologous stem cell transplantation, were sequenced (Fig. 2A, left panel). The initial tumor showed a missense mutation in *ATM* (most likely clonal ; 63% VAF ; *ATM* p.R1917S) together an *MLL3* mutation affecting amino acid residue p.A1685S (sub-clonal ; VAF 2%). At relapse, the same mutations were detectable, thus establishing clonal identity between the initial and very late relapse tumor clones and indicating a linear pattern of tumor evolution in this case. Of note, this patient did not receive maintenance therapy.

In the second case (FRA Mi), sequential gene panel monitoring was performed prior to treatment and following relapse from autologous and subsequently allogeneic bone marrow transplantation (Fig. 2A, right panel). A *TRAF3* p.N517Qfs33 frameshift mutation that was present at diagnosis was detectable in the bone marrow and blood samples, respectively, at the time of relapse from autologous and allogeneic stem cell transplantation, respectively (8 year interval in total between diagnosis and relapse from allo-BMT) (Fig. 2A, right panel). In this case, however, a missense *TP53* p.K132R, that was not detectable at earlier time points, was observed in the peripheral blood at relapse from allogeneic bone marrow transplantation, indicative of branched clonal evolution from a founder clone with *TRAF3* mutation during disease evolution in this patient. This *TP53* p.K132R mutation is

likely to co-exist with the TRAF3 mutation in the same cell since both mutations are detectable at equivalent % VAF (around 20%).

In a third case that was refractory to initial therapy by the RiBVD regimen, sequential monitoring by gene panel sequencing was performed prior to therapy and upon relapse or suboptimal response to multiple salvage therapies thereafter, including splenectomy, R-DHA-T (Temsorilimus), and ibrutinib therapy (Fig. 2B). Targeted deep sequencing in this case was performed in 5 consecutive blood samples. Initial gene panel mutation screening identified non synonymous mutations in TP53 and the NFκB pathway regulator MAP3K14, in addition to two synonymous mutations (DLC1, BIRC2 gene mutations) which we retained for their use as clonal markers. Following failure of RiBVD this patient went on to receive the R-DHA-T (temsirolimus regimen) followed by rituximab alone and Ibrutinib monotherapy. While this strategy achieved regression of the TP53 mutant clone, as judged by reduced mutant allele burden over time, tumour escape occurred on ibrutinib with rebound of the TP53 mutant clone originally detected at diagnosis and following non response to R-DHA-T (interestingly the DLC1 mutant clone did not reappear). This patient subsequently died of disease, thus underscoring the highly aggressive phenotype of TP53 mutant MCL clones. An unusual finding in this case was the persistence of both the *MAP3K14* and *BIRC2* mutations throughout the monitoring phase, suggesting that these somatic mutations may be present in an independent clone that is not contributing directly to clinically-manifest disease in this patient.

In view of the findings above, we next wished to extend our targeted deep sequencing analysis to primary refractory versus long term responder patients. We chose to do this initially in a small subgroup of patients treated in a phase II trial by the French Lymphoma Study Association investigating the efficacy of the RiBVD regimen for first line treatment of elderly MCL patients (without maintenance) (Fig. 3A). This was of interest to us, because TP53 mutation status has not been assessed for clinical impact in the setting of combination therapy with proteasome inhibitors in MCL. We determined the mutation profiles in the pre-treatment peripheral blood of three MCL cases with early refractory disease compared to

those of 5 patients with long term molecular and clinical remission in the RiBVD trial (more than 36 months). Quite strikingly, 3 of 3 refractory cases (including LEV Fr discussed above) showed TP53 mutations compared to 0/5 *TP53* mutant cases in the 5 RiBVD ‘long-responder’ MCL cases. Additional mutations in the refractory cases targeted the MLL2, MEF2B and MAP3K14 genes (although as discussed above, the MAP3K14 mutation, albeit deleterious, may not involve the clinically relevant clone in this instance). In sharp contrast, the RiBVD-sensitive cases showed mutations in *ATM*, *TET2* and *TLR2*. Taken together this implicates TP53 and transcription factor / epigenetic signaling pathways in *de novo* resistance to RiBVD therapy in MCL. In view of our initial goal to evaluate gene panel sequencing to derive molecular markers for precision oncology in MCL, and keeping in mind the role of TP53 in our primary refractory and linear and branched clonal evolution events leading to late relapse in the transplant setting (5 / 11 cases in total), we assessed TP53 mutation by targeted re-sequencing in the whole cohort of the RiBVD trial in a single gene assay (72 patients). *TP53* mutation conferred inferior overall and progression free survival in this homogenously-treated patient cohort (Fig. 3B), suggesting that bendamustine combined with proteasome inhibitors does not overcome the poor prognostic impact of TP53 mutation in MCL, as observed in high dose cytarabine-based regimens in MCL (2).

TP53 mutation identifies a novel subgroup of MCL characterized by non-canonical NFKB, MYC and alternative DNA damage repair signaling pathways.

We next asked what biological pathways might be enriched in TP53 mutant versus wildtype cases. For this we performed gene expression profiling across 17 of our initial 22 MCL patients (14 TP53 wild type compared to 3 TP53 mutant MCL cases) coupled to Gene Set Enrichment Analysis to identify pathways that are differentially enriched between these two genetically defined subgroups. This approach identified numerous differentially expressed genes involved in diverse signaling pathways between TP53 wild type and mutant MCL. Of note, TP53 wild type compared to mutant MCL tumors were significantly enriched for a MYC-

CCND1 neoplastic transformation network as well as cytotoxic T cell and IRF4-dependent gene expression programs (Fig. 3C near right panel). By contrast, TP53 mutant MCL were enriched for DNA repair pathways centering on BRCA proteins, alternative NFkB signaling and a MYC core networks, the latter of which is implicated in sustaining embryonic stem-like activity in aggressive blood and solid cancers (Fig. 3C far right panel).

DISCUSSION

In this study, we set out to assess the feasibility and clinical utility of performing targeted deep sequencing of recurrently mutated genes for mutation profiling prior to, during and post treatment in MCL. Based on strict criteria, we designed a 44 gene MCL panel to which we added an additional 3 genes for their potential interest for differential diagnostic purposes with other small lymphocytic lymphoma / B-cell chronic lymphocytic leukemia (*MYD88*, *SF3B1*)(10) or for predicting treatment resistance (*BTK*) (12). We could show the overall feasibility and clinical interest of this deep sequencing gene panel, even if *NOTCH1* mutations had to be sequenced separately because of design failure in our AmpliSeq assay. Our gene panel uncovered mutations in the selected genes at the expected frequencies. It should be noted that a sizable number of genes in our panel did not show mutations in our MCL study cohort.

Mutations of keen interest were those affecting ATM and TP53 for their high frequency (ATM) and implication in multiple modes of treatment resistance and failure in our study. Loss of function mutations in TP53 and ATM, both involved with DNA repair, are adverse prognostic indicators, in a variety of lymphoid malignancies. It is reasonable to propose that TP53 mutation profiling prior will be of use for risk stratification and precision oncology in MCL. In this work we implicate, for the first time, TP53 mutations and epigenetic / TF activity in poor response to proteasome inhibitor-based immune-chemotherapy (RiBVD). Even if performed in only a few cases, late relapse from auto or allo-BMT also appears to implicate TP53 mutation. Our study indicates that combining mutation scoring and gene

expression profiling can offer insights to disease resistance mechanisms. For example, increased reliance on alternative DNA repair pathways in TP53 mutant MCL cells might render these sensitive to inhibitors acting on these pathways, as in solid tumours (PARP inhibitors, for example). Likewise, dependency on a MYC-driven stem cell programs or escape from immune surveillance raises the possibility that targeting MYC or immune checkpoints might be good therapeutic strategies in TP53-mutant MCL. More detailed functional screens are warranted to test these hypotheses, at least pre-clinically.

Mutations in epigenetic signaling factor-encoding genes were observed in a total of 9 / 30 of our MCL cases (30% ; *SMARCA4*, *WHSC1*, *MLL2*, *MLL3*, *CHD2* and *TET2* mutations). The genes targeted by mutation all encode factors that regulate complex interconnecting epigenetic signaling networks involving chromatin remodeling during differentiation and DNA damage, or that mediate histone modifications involved in genome wide control of orderly gene transcription / enhancer activity (13). Although our series is relatively small, mutation profiling implicates at least MLL2 and MLL3 dysfunction in MCL treatment resistance or relapse.

Of note the *CHD2* gene, also mutated in B-CLL, was seen in one MCL case with an isolated t(11;14)(q13;q32) and *RB1* and *CCND1* mutations. The high VAF was suggestive of this mutation occurring secondary to the t(11;14) but prior to the additional mutations, suggestive of a potential driver role in MCL. The functional roles of CHD2, a member of the CHD family of SNF2 adenosine triphosphate (ATP)–dependent chromatin remodelers, are increasingly well defined at the chromatin level. Homozygous *Chd2* mutant mice show embryonic growth delay and perinatal lethality, and heterozygous animals undergo reduced neonatal viability and decreased life span. *Chd2* heterozygous mutants die because of multiple lymphomas and lymphoid hyperplasias supporting *CHD2* as a candidate driver gene in hematologic malignancies, including MCL (14, 15).

MCL risk stratification currently relies on clinical parameters and increasingly treatment response criteria rely on both clinical and minimal residual disease response rates. Maintenance therapy for younger patients having received auto-BMT is set to become the

standard of care (Le Gouill, S et al, accepted NEJM, 2017). It is now desirable to move beyond the MIPI and MRD criteria towards a more molecular based risk score. While this may prove challenging given the low frequency of many recurrent mutations in MCL, our work suggests that such approaches are at the least technically feasible. Efforts in this direction are already underway in other lymphoma types. The Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) recently proposed a combined follicular lymphoma (FL) risk model called m7-FLIPI based on the mutation status of 7 genes (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP*, and *CARD11*) and the performance status according to the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) (16). The m7-FLIPI model stratifies patients into high-risk and low-risk groups, which in retrospective analysis showed improved prognostication compared with FLIPI alone. Design of similar molecular-based algorithms incorporating if possible gene expression signatures are important goals for the future management of MCL.

Acknowledgements

Funding in the MBC laboratory is from INCa-AVIESAN 'épigénétique et cancer' program. Additional support was from Janssen-Cilag and Mundipharma. Sarah Bertrand received doctoral funding from the French ministry for higher education and research. Azadeh Hajmirza acknowledges the Société Française d'Hématologie for 4th year PhD funding.

BIBLIOGRAPHY

1. P. Jares, D. Colomer, E. Campo, Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *The Journal of clinical investigation* **122**, 3416 (Oct, 2012).
2. M. H. Delfau-Larue *et al.*, High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood* **126**, 604 (Jul 30, 2015).
3. E. M. Hartmann *et al.*, Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* **116**, 953 (Aug 12, 2010).
4. B. Meissner *et al.*, The E3 ubiquitin ligase UBR5 is recurrently mutated in mantle cell lymphoma. *Blood* **121**, 3161 (Apr 18, 2013).
5. R. Kridel *et al.*, Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood* **119**, 1963 (Mar 1, 2012).
6. J. Zhang *et al.*, The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood* **123**, 2988 (May 8, 2014).
7. R. Rahal *et al.*, Pharmacological and genomic profiling identifies NF-kappaB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nature medicine* **20**, 87 (Jan, 2014).
8. S. Bea *et al.*, Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 18250 (Nov 5, 2013).
9. A. Emadali *et al.*, Haploinsufficiency for NR3C1, the gene encoding the glucocorticoid receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms. *Blood* **127**, 3040 (Jun 16, 2016).
10. S. H. Swerdlow *et al.*, The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375 (May 19, 2016).
11. A. Clipson *et al.*, KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia* **29**, 1177 (May, 2015).
12. D. Chiron *et al.*, Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer discovery* **4**, 1022 (Sep, 2014).
13. M. A. Dawson, The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. *Science* **355**, 1147 (Mar 17, 2017).
14. P. Nagarajan *et al.*, Role of chromodomain helicase DNA-binding protein 2 in DNA damage response signaling and tumorigenesis. *Oncogene* **28**, 1053 (Feb 26, 2009).
15. D. Rodriguez *et al.*, Mutations in CHD2 cause defective association with active chromatin in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **126**, 195 (Jul 09, 2015).
16. A. Pastore *et al.*, Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *The Lancet. Oncology* **16**, 1111 (Sep, 2015).

FIGURE LEGENDS :

Figure 1: Targeted deep-sequencing gene panel for MCL

A. Design strategy for the selection of genes included in MCL custom panel. * 3 genes added *SF3B1* and *MYD88* (differential diagnosis with other small lymphocytic lymphoma) and *BTK* for ibrutinib resistance screening. **B.** Heatmap depicting the somatic mutation pattern identified in 6 MCL cell lines and 22 MCL cases (diagnosis samples). Each row represents a gene and each column represents a primary tumor/cell line. Vertical bar graph show the frequency of somatic mutations for each gene in our study (blue bars) and in a meta-analysis of main NGS published studies in MCL (grey bars). Biological function associated with mutated genes are represented on the left.

Figure 2: Gene panel-based mutation profiling identifies a central role for TP53 and epigenetic modifiers in relapsing and treatment refractory MCL.

Longitudinal follow-up for patients BER Ra, FRA Mi (**A**) and LEV Fr (**B**). Schematic representation of the clinical evolution of the disease (upper panel). IGV screenshots depicting the mutated regions for each follow-up sample (lower panel). Sequencing depth and VAF (variant allele frequency) are given for each variant. **B.** Heatmap depicting the mutation pattern for the 5 samples analyzed (lower panel, left). Evolution of the VAF for each variant during disease evolution (lower panel, right).

Figure 3: TP53 mutation identifies a novel subgroup of MCL characterized by non-canonical NFkB, MYC and alternative DNA damage repair signaling pathways.

A. Heatmap depicting the somatic mutation patterns identified in 8 MCL RIBVD cases (3 primary refractory and 5 sensitive 'long term responders', as indicated). **B.** Kaplan–Meier cumulative survival curves depicting overall (upper panel) and progression free (lower panel) survival between *TP53* wt and *TP53* mut cases, p values from log-rank test. **C.** Schematic representation of the position of somatic variants identified in this study on *TP53* protein (upper left panel) ; Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) enrichment plots obtained from gene expression data from *TP53* wt and *TP53* mut cases (right panel) and associated heatmap (lower, left panel).

Figure S1: Distribution of mutations in ATM and CCND1 in MCL.

A. Distribution of *ATM* mutations in our MCL series (above *ATM* protein map) compared to previously described *ATM* mutations in MCL (below the *ATM* protein map, Bea et al, PNAS 2013). **B.** Distribution of *CCND1* mutations in MCL in the present study (above the *CCND1* protein map) compared to previously described *CCND1* mutations in MCL (Kridel et al; Blood, 2012, *Beà et al; PNAS, 2013, Meissner et al; Blood, 2013*). Green circles : missense mutations. All *CCND1* mutations (E35, Y44 and C47) reported in the present study were previously described.

Discussion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse a été, d'une part, de mettre en place un outil de séquençage ciblé à haut débit à travers la création d'un panel personnalisé de 47 gènes d'intérêt pour le lymphome à cellules du manteau ainsi que 2 gènes choisis pour leurs potentiels dans le diagnostic différentiel tels que MYD88 (maladie de Waldenström) et SF3B1 (leucémie lymphoïde chronique) ainsi que BTK pour son rôle dans la résistance au traitement Ibrutinib. Le choix de ces gènes, basé sur des critères stricts, s'est fondé sur une étude bibliographique approfondie des articles de références dans le domaine de la génétique du lymphome à cellules du manteau publiés entre 2012 et 2015. La précision et la robustesse de notre outil de séquençage ont pu être démontrées via le séquençage de 6 lignées cellulaires ainsi que 30 patients atteints de lymphome à cellules du manteau. En effet, les mutations des gènes inclus dans notre panel ont été retrouvées à des fréquences similaires à celles décrites dans la littérature.

ATM et TP53, jouant tous deux un rôle majeur dans la réparation de l'ADN, ont été identifiés comme fréquemment mutés dans les lymphomes à cellules du manteau et associées à des résistances thérapeutiques. En effet, le lien entre la présence de mutations TP53 et la résistance au traitement RiBVD (Rituximab, Bendamustine, Velcade, Dexaméthasone) et des rechutes après auto ou allogreffe, a pu être établi dans notre étude. Il est d'ailleurs admis qu'ATM et TP53 jouent tous deux un rôle d'indicateurs de mauvais pronostic dans diverses hémopathies malignes. Il est donc pertinent de proposer l'analyse du profil mutationnel d'ATM et surtout de TP53 au moment du diagnostic des patients atteints de lymphome à cellules du manteau afin d'établir le pronostic des patients mutés mais aussi dans un contexte de rechutes ou de cas réfractaires à certaines thérapies afin de proposer, si possible, un traitement mieux adapté. Nous avons également discuté le fait que ces résistances/échecs de traitement pouvaient être en lien avec un échappement à la surveillance immunitaire ainsi qu'avec une signature cellules souches de la voie de signalisation MYC. Ces deux aspects pourraient donc constituer des pistes thérapeutiques intéressantes chez les patients mutés pour TP53 mais cette hypothèse nécessite d'être étayée.

D'autre part, ce projet avait également pour ambition de comprendre l'évolution sous-clonale chez certains patients à travers une étude longitudinale approfondie de plusieurs échantillons tumoraux. Ces études longitudinales peuvent apporter des éléments nécessaires à la compréhension de « l'orchestration » tumorale ; en d'autres termes, ces études aident à évaluer si des mutations génétiques spécifiques peuvent être à l'origine de la sélection de tel ou tel sous-clone tumoral qui pourrait directement être impliqué dans le phénomène de rechute. Un équilibre dynamique existe entre les sous-clones et avec leur environnement façonnant leur évolution. La capacité à identifier les altérations génétiques dans les clones et les sous-clones tumoraux mais aussi leur détection avant l'apparition de cette complexité génétique, sont des enjeux de l'onco-hématologie moderne.

Dans ce contexte nous avons décrit ce type de situation, impliquant un clone TP53 dans un cas de suivi longitudinal d'un cas multi-réfractaire.

Outre ces mutations TP53, des mutations au sein de régulateurs épigénétiques ont été identifiées au sein de notre cohorte de patients atteints de lymphomes à cellules du manteau telles que les mutations au sein des histones méthyltransférases MLL2 et MLL3 ; du régulateur SWI/SNF, SMARCA4 ; des régulateurs chromatinien UBR5, WHSC1 et CHD2. Chez les patients ayant montré une résistance au schéma RiBVD, les mutations TP53 sont d'ailleurs associées à des mutations au sein de MEF2B et MLL2 ou encore à des mutations au sein du gène MAP3K14, récemment identifié comme étant un acteur potentiellement impliqué dans la résistance de certains patients aux thérapies inhibitrices de la voie de signalisation issue du BCR telles que l'Ibrutinib.

Il est intéressant de noter, de plus, que les mutations CHD2 ont déjà été décrites dans les leucémies lymphoïdes chroniques. De plus, il a été décrit dans la littérature que des mutants murins hétérozygotes pour Chd2 meurent à cause de lymphomes multiples, ceci laissant suggérer que le gène CHD2 pourrait être un candidat intéressant dans les hémopathies malignes incluant le lymphome à cellules du manteau. Toutefois, ceci devrait être confirmé dans une plus grande cohorte de patients étant donné la faible fréquence des mutations CHD2.

Ces mutations au sein de régulateurs épigénétiques, largement décrites dans le lymphome à cellule du manteau, suggère que cette pathologie pourrait être qualifiée de maladie épigénétique, comme le témoigne la perturbation de certaines marques d'histones

comme par exemple la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 actuellement étudiée par notre équipe. Cette stratification du paysage mutationnel des patients atteints du lymphome à cellules du manteau témoigne également qu'il est important de l'aborder désormais avec une approche basée sur un score de risque associant paramètres cliniques et mutations au sein de gènes clés. Cet aspect apparaît encore toutefois comme un défi étant donné la faible fréquence mutationnelle des gènes associés au lymphome du manteau. Certaines études comme le groupe ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) proposent déjà un modèle de risque appelé le m7-FLIPI basé sur le statut mutationnel de 7 gènes (EZH2, ARID1A, MEF2B, EP300, FOXO1, CREBBP et CARD11) pour le lymphome folliculaire. Le design d'algorithmes moléculaires similaires incorporant si possible également des signatures géniques sont des objectifs importants pour la future prise en charge des patients atteints de lymphome à cellules du manteau.

Bibliographie

Aggarwal, P., Vaites, L.P., Kim, J.K., Mellert, H., Gurung, B., Nakagawa, H., Herlyn, M., Hua, X., Rustgi, A.K., McMahon, S.B., et al. (2010). Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase. *Cancer cell* 18, 329-340.

Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nature immunology* 4, 168-174.

Ansell, S.M., Tang, H., Kurtin, P.J., Koenig, P.A., Inwards, D.J., Shah, K., Ziesmer, S.C., Feldman, A.L., Rao, R., Gupta, M., et al. (2011). Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a phase 2 study. *The Lancet Oncology* 12, 361-368.

Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M., et al. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79, 885-892.

Baumann, K., Casewell, N.R., Ali, S.A., Jackson, T.N., Vetter, I., Dobson, J.S., Cutmore, S.C., Nouwens, A., Lavergne, V., and Fry, B.G. (2014). A ray of venom: Combined proteomic and transcriptomic investigation of fish venom composition using barb tissue from the blue-spotted stingray (*Neotrygon kuhlii*). *Journal of proteomics* 109, 188-198.

Bea, S., Valdes-Mas, R., Navarro, A., Salaverria, I., Martin-Garcia, D., Jares, P., Gine, E., Pinyol, M., Royo, C., Nadeu, F., et al. (2013). Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 18250-18255.

Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.

Benavides, M., Chow-Tsang, L.F., Zhang, J., and Zhong, H. (2013). The novel interaction between microspherule protein Msp58 and ubiquitin E3 ligase EDD regulates cell cycle progression. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 21-32.

Bhadury, J., Nilsson, L.M., Muralidharan, S.V., Green, L.C., Li, Z., Gesner, E.M., Hansen, H.C., Keller, U.B., McLure, K.G., and Nilsson, J.A. (2014). BET and HDAC inhibitors induce similar genes and biological effects and synergize to kill in Myc-induced murine lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E2721-2730.

Bienvenu, F., Jirawatnotai, S., Elias, J.E., Meyer, C.A., Mizeracka, K., Marson, A., Frampton, G.M., Cole, M.F., Odom, D.T., Odajima, J., et al. (2010). Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen. *Nature* 463, 374-378.

- Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annual review of immunology* 22, 55-79.
- Byrd, J.C., Furman, R.R., Coutre, S.E., Flinn, I.W., Burger, J.A., Blum, K.A., Grant, B., Sharman, J.P., Coleman, M., Wierda, W.G., et al. (2013). Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 369, 32-42.
- Campo, E., and Rule, S. (2015). Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. *Blood* 125, 48-55.
- Campo, E., Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H., and Jaffe, E.S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117, 5019-5032.
- Ceredig, R., Rolink, A.G., and Brown, G. (2009). Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nature reviews Immunology* 9, 293-300.
- Cheah, C.Y., Seymour, J.F., and Wang, M.L. (2016). Mantle Cell Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34, 1256-1269.
- Cheung, K.J., Horsman, D.E., and Gascoyne, R.D. (2009). The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *British journal of haematology* 146, 257-269.
- Chiron, D., Di Liberto, M., Martin, P., Huang, X., Sharman, J., Bleuca, P., Mathew, S., Vijay, P., Eng, K., Ali, S., et al. (2014). Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer discovery* 4, 1022-1035.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature immunology* 8, 463-470.
- DeKoter, R.P., Lee, H.J., and Singh, H. (2002). PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* 16, 297-309.
- DeKoter, R.P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.
- Delarue, R., Haioun, C., Ribrag, V., Brice, P., Delmer, A., Tilly, H., Salles, G., Van Hoof, A., Casasnovas, O., Brousse, N., et al. (2013). CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 121, 48-53.
- Dreyling, M., Jurczak, W., Jerkeman, M., Silva, R.S., Rusconi, C., Trneny, M., Offner, F., Caballero, D., Joao, C., Witzens-Harig, M., et al. (2016). Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 387, 770-778.
- Fabbri, G., Rasi, S., Rossi, D., Trifonov, V., Khiabani, H., Ma, J., Grunn, A., Fangazio, M., Capello, D., Monti, S., et al. (2011). Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding

- genome: role of NOTCH1 mutational activation. *The Journal of experimental medicine* 208, 1389-1401.
- Fisher, R.I., Bernstein, S.H., Kahl, B.S., Djulbegovic, B., Robertson, M.J., de Vos, S., Epner, E., Krishnan, A., Leonard, J.P., Lonial, S., et al. (2006). Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 4867-4874.
- Flordal Thelander, E., Ichimura, K., Collins, V.P., Walsh, S.H., Barbany, G., Hagberg, A., Laurell, A., Rosenquist, R., Larsson, C., and Lagercrantz, S. (2007). Detailed assessment of copy number alterations revealing homozygous deletions in 1p and 13q in mantle cell lymphoma. *Leukemia research* 31, 1219-1230.
- Foran, J.M., Rohatiner, A.Z., Cunningham, D., Popescu, R.A., Solal-Celigny, P., Ghielmini, M., Coiffier, B., Johnson, P.W., Gisselbrecht, C., Reyes, F., et al. (2000). European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18, 317-324.
- Forstpointner, R., Unterhalt, M., Dreyling, M., Bock, H.P., Repp, R., Wandt, H., Pott, C., Seymour, J.F., Metzner, B., Hanel, A., et al. (2006). Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood* 108, 4003-4008.
- Fouquet, G., Guidez, S., Petillon, M.O., Louni, C., Ohya, B., Dib, M., Poulain, S., Herbaux, C., Martin, A., Thielemans, B., et al. (2015). Lenalidomide is safe and active in Waldenstrom macroglobulinemia. *American journal of hematology* 90, 1055-1059.
- Fournier, A., McLeer-Florin, A., Lefebvre, C., Duley, S., Barki, L., Ribeyron, J., Alboukadel, K., Hamaidia, S., Granjon, A., Gressin, R., et al. (2010). 1q12 chromosome translocations form aberrant heterochromatic foci associated with changes in nuclear architecture and gene expression in B cell lymphoma. *EMBO molecular medicine* 2, 159-171.
- Fu, K., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Dave, S., Wright, G., Rosenwald, A., Chiorazzi, M., Iqbal, J., Gesk, S., Siebert, R., et al. (2005). Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 106, 4315-4321.
- Geisler, C.H., Kolstad, A., Laurell, A., Andersen, N.S., Pedersen, L.B., Jerkeman, M., Eriksson, M., Nordstrom, M., Kimby, E., Boesen, A.M., et al. (2008). Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood* 112, 2687-2693.
- Gekas, C., Rhodes, K.E., Gereige, L.M., Helgadottir, H., Ferrari, R., Kurdistani, S.K., Montecino-Rodriguez, E., Bassel-Duby, R., Olson, E., Krivtsov, A.V., et al. (2009). Mef2C is a lineage-restricted target of Scl/Tal1 and regulates megakaryopoiesis and B-cell homeostasis. *Blood* 113, 3461-3471.

- Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nature reviews Immunology* 2, 162-174.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143-156.
- Gesk, S., Klapper, W., Martin-Subero, J.I., Nagel, I., Harder, L., Fu, K., Bernd, H.W., Weisenburger, D.D., Parwaresch, R., and Siebert, R. (2006). A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 108, 1109-1110.
- Gowans, J.L. (1965). The Role of Lymphocytes in the Destruction of Homografts. *British medical bulletin* 21, 106-110.
- Goy, A., Sinha, R., Williams, M.E., Kalayoglu Besisik, S., Drach, J., Ramchandren, R., Zhang, L., Cicero, S., Fu, T., and Witzig, T.E. (2013). Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 3688-3695.
- Greenbaum, S., and Zhuang, Y. (2002). Identification of E2A target genes in B lymphocyte development by using a gene tagging-based chromatin immunoprecipitation system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15030-15035.
- Greiner, T.C., Dasgupta, C., Ho, V.V., Weisenburger, D.D., Smith, L.M., Lynch, J.C., Vose, J.M., Fu, K., Armitage, J.O., Braziel, R.M., et al. (2006). Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2352-2357.
- Gudjonsson, P.S., Mariusdottir, E., Palsdottir, H.B., Einarsson, G.V., Jonsson, E., Petursdottir, V., Hardarson, S., Sigurdsson, M.I., and Gudbjartsson, T. (2012). [Small renal cell carcinomas and synchronous metastases]. *Laeknabladid* 98, 585-589.
- Hagens, O., Minina, E., Schweiger, S., Ropers, H.H., and Kalscheuer, V. (2006). Characterization of FBX25, encoding a novel brain-expressed F-box protein. *Biochimica et biophysica acta* 1760, 110-118.
- Hagman, J., Gutch, M.J., Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). EBF contains a novel zinc coordination motif and multiple dimerization and transcriptional activation domains. *The EMBO journal* 14, 2907-2916.
- Halldorsdottir, A.M., Lundin, A., Murray, F., Mansouri, L., Knuutila, S., Sundstrom, C., Laurell, A., Ehrencrona, H., Sander, B., and Rosenquist, R. (2011). Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 25, 1904-1908.

- Henderson, M.J., Munoz, M.A., Saunders, D.N., Clancy, J.L., Russell, A.J., Williams, B., Pappin, D., Khanna, K.K., Jackson, S.P., Sutherland, R.L., et al. (2006). EDD mediates DNA damage-induced activation of CHK2. *The Journal of biological chemistry* 281, 39990-40000.
- Herglotz, J., Unrau, L., Hauschildt, F., Fischer, M., Kriebitzsch, N., Alawi, M., Indenbirken, D., Spohn, M., Muller, U., Ziegler, M., et al. (2016). Essential control of early B-cell development by Mef2 transcription factors. *Blood* 127, 572-581.
- Herrmann, A., Hoster, E., Zwingers, T., Brittinger, G., Engelhard, M., Meusers, P., Reiser, M., Forstpointner, R., Metzner, B., Peter, N., et al. (2009). Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 511-518.
- Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., et al. (2009). Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 3822-3829.
- Holkova, B., Perkins, E.B., Ramakrishnan, V., Tombes, M.B., Shrader, E., Talreja, N., Wellons, M.D., Hogan, K.T., Roodman, G.D., Coppola, D., et al. (2011). Phase I trial of bortezomib (PS-341; NSC 681239) and alvocidib (flavopiridol; NSC 649890) in patients with recurrent or refractory B-cell neoplasms. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 3388-3397.
- Hromas, R., Orazi, A., Neiman, R.S., Maki, R., Van Beveran, C., Moore, J., and Klemsz, M. (1993). Hematopoietic lineage- and stage-restricted expression of the ETS oncogene family member PU.1. *Blood* 82, 2998-3004.
- Inwards, D.J., Fishkin, P.A., Hillman, D.W., Brown, D.W., Ansell, S.M., Kurtin, P.J., Fonseca, R., Morton, R.F., Veeder, M.H., and Witzig, T.E. (2008). Long-term results of the treatment of patients with mantle cell lymphoma with cladribine (2-CDA) alone (95-80-53) or 2-CDA and rituximab (N0189) in the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer* 113, 108-116.
- Jaccard, A., Gachard, N., Marin, B., Rogez, S., Audrain, M., Suarez, F., Tilly, H., Morschhauser, F., Thieblemont, C., Ysebaert, L., et al. (2011). Efficacy of L-asparaginase with methotrexate and dexamethasone (AspaMetDex regimen) in patients with refractory or relapsing extranodal NK/T-cell lymphoma, a phase 2 study. *Blood* 117, 1834-1839.
- Jares, P., Colomer, D., and Campo, E. (2007). Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nature reviews Cancer* 7, 750-762.
- Jares, P., Colomer, D., and Campo, E. (2012). Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *The Journal of clinical investigation* 122, 3416-3423.
- Jelinek, D.F., Tschumper, R.C., Stolovitzky, G.A., Iturria, S.J., Tu, Y., Lepre, J., Shah, N., and Kay, N.E. (2003). Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Molecular cancer research : MCR* 1, 346-361.

- Jones, J.A., Rupert, A.S., Poi, M., Phelps, M.A., Andritsos, L., Baiocchi, R., Benson, D.M., Blum, K.A., Christian, B., Flynn, J., et al. (2014). Flavopiridol can be safely administered using a pharmacologically derived schedule and demonstrates activity in relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma. *American journal of hematology* 89, 19-24.
- Jones, P.A., Issa, J.P., and Baylin, S. (2016). Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature reviews Genetics* 17, 630-641.
- Katz, S.G., Labelle, J.L., Meng, H., Valeriano, R.P., Fisher, J.K., Sun, H., Rodig, S.J., Kleinstein, S.H., and Walensky, L.D. (2014). Mantle cell lymphoma in cyclin D1 transgenic mice with Bim-deficient B cells. *Blood* 123, 884-893.
- Kaufmann, H., Raderer, M., Wohrer, S., Puspok, A., Bankier, A., Zielinski, C., Chott, A., and Drach, J. (2004). Antitumor activity of rituximab plus thalidomide in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Blood* 104, 2269-2271.
- Kelley, C.M., Ikeda, T., Koipally, J., Avitahl, N., Wu, L., Georgopoulos, K., and Morgan, B.A. (1998). Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Current biology : CB* 8, 508-515.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., et al. (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* 10, 345-355.
- Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P., and Chan, S. (2002). Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *European journal of immunology* 32, 720-730.
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J., and Georgopoulos, K. (1999). Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *The EMBO journal* 18, 3090-3100.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Kridel, R., Meissner, B., Rogic, S., Boyle, M., Telenius, A., Woolcock, B., Gunawardana, J., Jenkins, C., Cochrane, C., Ben-Neriah, S., et al. (2012). Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood* 119, 1963-1971.
- Kurosaki, T., Takata, M., Yamanashi, Y., Inazu, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T., and Yamamura, H. (1994). Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *The Journal of experimental medicine* 179, 1725-1729.
- Lavin, M.F., and Kozlov, S. (2007). ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6, 931-942.
- LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570-1580.
- Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wormann, B., Duhrsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., et al. (2005). Immunochemotherapy with

rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 1984-1992.

Li, J., Wong, W.H., Chan, S., Chim, J.C., Cheung, K.M., Lee, T.L., Au, W.Y., Ha, S.Y., Lie, A.K., Lau, Y.L., et al. (2011). Factors affecting mesenchymal stromal cells yield from bone marrow aspiration. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* 23, 43-48.

Maddocks, K.J., Ruppert, A.S., Lozanski, G., Heerema, N.A., Zhao, W., Abruzzo, L., Lozanski, A., Davis, M., Gordon, A., Smith, L.L., et al. (2015). Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA oncology* 1, 80-87.

Mardis, E.R., and Wilson, R.K. (2009). Cancer genome sequencing: a review. *Human molecular genetics* 18, R163-168.

Martinez-Climent, J.A., Vizcarra, E., Sanchez, D., Blesa, D., Marugan, I., Benet, I., Sole, F., Rubio-Moscardo, F., Terol, M.J., Climent, J., et al. (2001). Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 98, 3479-3482.

Meissner, B., Kridel, R., Lim, R.S., Rogic, S., Tse, K., Scott, D.W., Moore, R., Mungall, A.J., Marra, M.A., Connors, J.M., et al. (2013). The E3 ubiquitin ligase UBR5 is recurrently mutated in mantle cell lymphoma. *Blood* 121, 3161-3164.

Meusers, P., Engelhard, M., Bartels, H., Binder, T., Fulle, H.H., Gorg, K., Gunzer, U., Havemann, K., Kayser, W., Konig, E., et al. (1989). Multicentre randomized therapeutic trial for advanced centrocytic lymphoma: anthracycline does not improve the prognosis. *Hematological oncology* 7, 365-380.

Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S., and Georgopoulos, K. (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *The EMBO journal* 16, 2004-2013.

Morin, R.D., Mendez-Lago, M., Mungall, A.J., Goya, R., Mungall, K.L., Corbett, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Chiu, R., Field, M., et al. (2011). Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476, 298-303.

Mullighan, C.G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C.B., Coustan-Smith, E., Dalton, J.D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S.B., et al. (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446, 758-764.

Munoz, M.A., Saunders, D.N., Henderson, M.J., Clancy, J.L., Russell, A.J., Lehrbach, G., Musgrove, E.A., Watts, C.K., and Sutherland, R.L. (2007). The E3 ubiquitin ligase EDD regulates S-phase and G(2)/M DNA damage checkpoints. *Cell Cycle* 6, 3070-3077.

- Muntean, A.G., and Hess, J.L. (2012). The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annual review of pathology* 7, 283-301.
- Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A., and Sutherland, R.L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature reviews Cancer* 11, 558-572.
- Nguyen, A., Rosner, A., Milovanovic, T., Hope, C., Planutis, K., Saha, B., Chaiwun, B., Lin, F., Imam, S.A., Marsh, J.L., et al. (2005). Wnt pathway component LEF1 mediates tumor cell invasion and is expressed in human and murine breast cancers lacking ErbB2 (her-2/neu) overexpression. *International journal of oncology* 27, 949-956.
- Nutt, S.L., and Kee, B.L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26, 715-725.
- Olshavsky, N.A., Comstock, C.E., Schiewer, M.J., Augello, M.A., Hyslop, T., Sette, C., Zhang, J., Parysek, L.M., and Knudsen, K.E. (2010). Identification of ASF/SF2 as a critical, allele-specific effector of the cyclin D1b oncogene. *Cancer research* 70, 3975-3984.
- Pileri, S.A., and Falini, B. (2009). Mantle cell lymphoma. *Haematologica* 94, 1488-1492.
- Potthoff, M.J., and Olson, E.N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134, 4131-4140.
- Puente, X.S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordonez, G.R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Bea, S., Gonzalez-Diaz, M., et al. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475, 101-105.
- Rahal, R., Frick, M., Romero, R., Korn, J.M., Kridel, R., Chan, F.C., Meissner, B., Bhang, H.E., Ruddy, D., Kauffmann, A., et al. (2014). Pharmacological and genomic profiling identifies NF-kappaB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nature medicine* 20, 87-92.
- Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., and Grosschedl, R. (2000). Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13, 15-24.
- Rodriguez, J., Gutierrez, A., Palacios, A., Navarrete, M., Blancas, I., Alarcon, J., Caballero, M.D., De Mattos, S.F., Gines, J., Martinez, J., et al. (2007). Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective regimen in patients with refractory and relapsing mantle cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 48, 2172-2178.
- Romaguera, J.E., Fayad, L., Rodriguez, M.A., Broglio, K.R., Hagemeister, F.B., Pro, B., McLaughlin, P., Younes, A., Samaniego, F., Goy, A., et al. (2005). High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 7013-7023.
- Rossi, D., Terzi-di-Bergamo, L., De Paoli, L., Cerri, M., Ghilardi, G., Chiarenza, A., Bulian, P., Visco, C., Mauro, F.R., Morabito, F., et al. (2015). Molecular prediction of durable

remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 126, 1921-1924.

Rubio-Moscardo, F., Climent, J., Siebert, R., Piris, M.A., Martin-Subero, J.I., Nieler, I., Garcia-Conde, J., Dyer, M.J., Terol, M.J., Pinkel, D., et al. (2005). Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 105, 4445-4454.

Rummel, M.J., Al-Batran, S.E., Kim, S.Z., Welslau, M., Hecker, R., Kofahl-Krause, D., Josten, K.M., Durk, H., Rost, A., Neise, M., et al. (2005). Bendamustine plus rituximab is effective and has a favorable toxicity profile in the treatment of mantle cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 3383-3389.

Rummel, M.J., Niederle, N., Maschmeyer, G., Banat, G.A., von Grunhagen, U., Losem, C., Kofahl-Krause, D., Heil, G., Welslau, M., Balser, C., et al. (2013). Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 381, 1203-1210.

Sachanas, S., Pangalis, G.A., Vassilakopoulos, T.P., Korkolopoulou, P., Kontopidou, F.N., Athanasoulia, M., Yiakoumis, X., Kalpadakis, C., Georgiou, G., Masouridis, S., et al. (2011). Combination of rituximab with chlorambucil as first line treatment in patients with mantle cell lymphoma: a highly effective regimen. *Leukemia & lymphoma* 52, 387-393.

Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G., and Tonegawa, S. (1979). Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 280, 288-294.

Schraders, M., Pfundt, R., Straatman, H.M., Janssen, I.M., van Kessel, A.G., Schoenmakers, E.F., van Krieken, J.H., and Groenen, P.J. (2005). Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* 105, 1686-1693.

Scott, D.W., and Gascoyne, R.D. (2014). The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nature reviews Cancer* 14, 517-534.

Sherr, C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-555.

Su, H., Meng, S., Lu, Y., Trombly, M.I., Chen, J., Lin, C., Turk, A., and Wang, X. (2011). Mammalian hyperplastic discs homolog EDD regulates miRNA-mediated gene silencing. *Molecular cell* 43, 97-109.

Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., and Seto, M. (2005). Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 24, 1348-1358.

Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.

- Villamor, N., Lopez-Guillermo, A., Lopez-Otin, C., and Campo, E. (2013). Next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in hematology* 50, 286-295.
- Visco, C., Finotto, S., Zambello, R., Paolini, R., Menin, A., Zanotti, R., Zaja, F., Semenzato, G., Pizzolo, G., D'Amore, E.S., et al. (2013). Combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for patients with mantle-cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 1442-1449.
- Wang, J.H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A.H., Bigby, M., and Georgopoulos, K. (1996). Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 5, 537-549.
- Wang, M., Fayad, L., Cabanillas, F., Hagemeister, F., McLaughlin, P., Rodriguez, M.A., Kwak, L.W., Zhou, Y., Kantarjian, H., and Romaguera, J. (2008). Phase 2 trial of rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus methotrexate-cytarabine for relapsed or refractory aggressive mantle cell lymphoma. *Cancer* 113, 2734-2741.
- Wang, Y., and Ma, S. (2014). Risk factors for etiology and prognosis of mantle cell lymphoma. *Expert review of hematology* 7, 233-243.
- West, A.G., Shore, P., and Sharrocks, A.D. (1997). DNA binding by MADS-box transcription factors: a molecular mechanism for differential DNA bending. *Molecular and cellular biology* 17, 2876-2887.
- Wilker, P.R., Kohyama, M., Sandau, M.M., Albring, J.C., Nakagawa, O., Schwarz, J.J., and Murphy, K.M. (2008). Transcription factor Mef2c is required for B cell proliferation and survival after antigen receptor stimulation. *Nature immunology* 9, 603-612.
- Witzig, T.E., Geyer, S.M., Kurtin, P.J., Colgan, J.P., Inwards, D.J., Micallef, I.N., LaPlant, B.R., Michalak, J.C., Salim, M., Dalton, R.J., et al. (2008). Salvage chemotherapy with rituximab DHAP for relapsed non-Hodgkin lymphoma: a phase II trial in the North Central Cancer Treatment Group. *Leukemia & lymphoma* 49, 1074-1080.
- Wu, L., Nichogiannopoulou, A., Shortman, K., and Georgopoulos, K. (1997). Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* 7, 483-492.
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D.D., Lay, F.D., Jones, P.A., and Liang, G. (2014). Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer cell* 26, 577-590.
- Ying, C.Y., Dominguez-Sola, D., Fabi, M., Lorenz, I.C., Hussein, S., Bansal, M., Califano, A., Pasqualucci, L., Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2013). MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nature immunology* 14, 1084-1092.
- Zhan, F., Barlogie, B., Arzoumanian, V., Huang, Y., Williams, D.R., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Tricot, G., van Rhee, F., Zangari, M., et al. (2007). Gene-expression signature of

benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood* 109, 1692-1700.

Zhang, J., Jima, D., Moffitt, A.B., Liu, Q., Czader, M., Hsi, E.D., Fedoriw, Y., Dunphy, C.H., Richards, K.L., Gill, J.I., et al. (2014). The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood* 123, 2988-2996.

Zhao, X., Lwin, T., Silva, A., Shah, B., Tao, J., Fang, B., Zhang, L., Fu, K., Bi, C., Li, J., et al. (2017). Unification of de novo and acquired ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Nature communications* 8, 14920.

Annexes

**1. Annexe 1 : Classification internationale des maladies pour
l'oncologie, troisième édition**

Tableau 13. Classement de l'OMS pour les tumeurs lymphoïdes et du système hématopoïétique

Note : Cette liste ne présente que les principales catégories de maladies.

{ } signale une autre dénomination possible pour la tumeur.

| TUMEURS MYELOIDES | |
|--------------------------|--|
| CIM-O | TERME DE L'OMS |
| | Maladies myéloprolifératives |
| 9875/3 | Leucémie myéloïde chronique, chromosome Philadelphie positif {t(9:22)(q34;q11)}, {ABL-BCR} |
| 9963/3 | Leucémie chronique à polynucléaires neutrophiles |
| 9964/3 | Leucémie chronique à éosinophiles/syndrome hyperéosinophilique |
| 9961/3 | Myélofibrose idiopathique chronique |
| 9950/3 | Maladie de Vaquez |
| 9962/3 | Thrombocythémie hémorragique essentielle |
| 9975/1 | Maladie myéloproliférative, inclassable |
| | Maladies myéloprolifératives/myélodysplasiques |
| 9945/3 | Leucémie chronique myélomonocytaire |
| 9876/3 | Leucémie myéloïde chronique atypique |
| 9946/3 | Leucémie myélomonocytaire chronique juvénile |
| | Syndromes myélodysplasiques |
| 9980/3 | Anémie réfractaire |
| 9982/3 | Anémie réfractaire avec sidérobastes en couronne |
| 9980/3 | Anémie réfractaire sans sidérobastes en couronne |
| 9985/3 | Anémie réfractaire (syndrome myélodysplasique) avec dysplasie de plusieurs lignées cellulaires |
| 9983/3 | Anémie réfractaire (syndrome myélodysplasique) avec excès de blastes |
| 9986/3 | Syndrome de délétion du bras court du chromosome 5 (5q-) |
| 9989/3 | Syndrome myélodysplasique, inclassable |
| | Leucémies aiguës myéloïdes (LAM) |
| | LAM avec translocations cytogénétiques récurrentes |
| 9896/3 | Leucémie aiguë myéloïde, {t(8;21)(q22;q22)}, {AML1(CBF-alpha)/ETO} |
| 9866/3 | Leucémie aiguë promyélocytaire, {LAM avec t(15;17)(q22;q11-12)} et variantes, |
| 9871/3 | Leucémie aiguë myéloïde avec éosinophiles médullaires anormaux {inv(16)(p13;q22)} ou {t(16;16)(p13;q11)}, {CBF-bêta/MYH11} |
| 9897/3 | Leucémie aiguë myéloïde, anomalies 11q23 {MLL} |
| 9895/3 | Leucémies aiguës myéloïdes avec dysplasie de plusieurs lignées cellulaires |
| 9895/3 | Avec antécédent de syndrome myélodysplasique |
| 9895/3 | Sans antécédent de syndrome myélodysplasique |
| 9920/3 | Leucémies aiguës myéloïdes et syndromes myélodysplasiques, secondaires à une thérapie |
| 9920/3 | Secondaire à une thérapie par agent alkylant |
| 9920/3 | Secondaire à une thérapie par épipodophyllotoxines (parfois lymphoïdes) |
| 9920/3 | Autres types |

Tableau 13 suite.

CIM-O TERME DE L'OMS

| | |
|--------|---|
| 9861/3 | LAM type non précisé par ailleurs |
| 9872/3 | Leucémie aiguë myéloïde, différenciation minimale |
| 9873/3 | Leucémie aiguë myéloïde sans maturation |
| 9874/3 | Leucémie myéloïde aiguë avec maturation |
| 9867/3 | Leucémie aiguë myélomonocytaire |
| 9891/3 | Leucémie aiguë monocytaire |
| 9840/3 | Erythroleucémie aiguë |
| 9910/3 | Leucémie aiguë à mégacaryocytes |
| 9870/3 | Leucémie aiguë à basophiles |
| 9931/3 | Panmyélose aiguë avec myélofibrose |
| 9805/3 | Leucémies aiguës biphénotypiques |

TUMEURS LYMPHOIDES**TUMEURS À CELLULES B****Tumeurs à cellules précurseurs B**

| | |
|--------|--|
| 9728/3 | Lymphome/leucémie lymphoblastique à cellules précurseurs B |
| 9836/3 | Leucémie lymphoblastique aiguë à cellules précurseurs B |

Tumeurs à cellules B matures (périphériques)

| | |
|---|--|
| 9823/3, 9670/3 | Leucémie lymphoïde chronique à cellules B/lymphome à petits lymphocytes |
| 9833/3 | Leucémie prolymphocytaire à cellules B |
| 9671/3 | Lymphome lymphoplasmocytoïde |
| 9689/3 | Lymphome à cellules B de la zone marginale splénique (avec ou sans lymphocytes villeux) |
| 9940/3 | Leucémie à tricholymphocytes |
| 9732/3, 9731/3 | Myélome plasmocytaire/plasmocytome |
| 9699/3 | Lymphome marginal à cellules B des tissus lymphoïdes muqueux (<i>type MALT</i>) |
| 9699/3 | Lymphome ganglionnaire de la zone marginale (avec/sans cellules B monocytaires) |
| 9690/3, 9691/3, 9695/3, 9698/3 | Lymphome folliculaire |
| 9673/3 | Lymphome à cellules du manteau |
| 9680/3 | Lymphome diffus à grandes cellules B |
| 9679/3 | Lymphome médiastinal à grandes cellules B |
| 9678/3 | Lymphome malin à épanchement primaire |
| 9687/3, 9826/3 | Lymphome de Burkitt/leucémie à cellules de Burkitt |

Tableau 13 suite.

| CIM-O | TERME DE L'OMS |
|---------|--|
| | TUMEURS À CELLULES T ET NK |
| | Tumeur à cellules précurseurs T |
| 9729/3 | Lymphome/leucémie lymphoblastique à cellules précurseurs T |
| 9837/3 | Leucémie lymphoblastique aiguë à cellules pré-T |
| | Tumeurs à cellules T matures (périphériques) |
| 9834/3 | Leucémie prolymphocytaire à cellules T |
| 9831/3 | Leucémie lymphoïde à cellules granuleuses T |
| 9948/3 | Leucémie agressive à cellules NK |
| 9827/3 | Leucémie/lymphome à cellules T, type adulte (HTLV-1 positif) |
| 9719/3 | Lymphome à cellules T/NK, type nasal |
| 9717/3 | Lymphome à cellules T, type entéropathique |
| 9716/3 | Lymphome hépatosplénique des cellules T gamma-delta |
| 9708/3 | Lymphome à cellules T simulant la panniculite |
| 9700/3, | Mycosis fongoïde/syndrome de Sézary |
| 9701/3 | |
| 9714/3 | Lymphome anaplasique à grandes cellules, type à cellules T et cellules nulles, cutané primitif |
| 9702/3 | Lymphome périphérique à cellules T, SAI |
| 9705/3 | Lymphome angioimmunoblastique à cellules T |
| 9714/3 | Lymphome anaplasique à grandes cellules, type à cellules T et cellules nulles, généralisé primitif |
| | LYMPHOME HODGKINIEN (MALADIE DE HODGKIN) |
| 9659/3 | Lymphome hodgkinien à prédominance lymphocytaire, forme nodulaire |
| 9650/3 | Lymphome hodgkinien classique |
| 9665/3, | Lymphome hodgkinien, sclérose nodulaire, grade 1 et 2 |
| 9667/3 | |
| 9651/3 | Lymphome hodgkinien classique riche en lymphocytes |
| 9652/3 | Lymphome de Hodgkin, cellularité mixte |
| 9653/3 | Lymphome de Hodgkin, déplétion lymphoïde |
| | TUMEURS À MASTOCYTES |
| 9741/3 | Mastocytose cutanée |
| 9741/3 | Maladie généralisée à mastocytes |
| 9742/3, | Leucémie/sarcome à mastocytes |
| 9740/3 | |
| | TUMEURS HISTIOCYTAIRES ET À CELLULES DENDRITIQUES |
| | Tumeur histiocytaire/à macrophages |
| 9755/3 | Sarcome histiocytaire |
| | Tumeurs à cellules dendritiques |
| 9751/1 | Histiocytose de Langerhans |
| 9756/3 | Sarcome à cellules de Langerhans |
| 9757/3 | Sarcome/tumeur à cellules dendritiques interdigitées |
| 9758/3 | Sarcome/tumeur folliculaire à cellules dendritiques |
| 9757/3 | Sarcome à cellules dendritiques, SAI |

2. Annexe 2 : Haploinsufficiency for NR3C1, the gene encoding the glucocorticoid receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms.

MYELOID NEOPLASIA

Haploinsufficiency for *NR3C1*, the gene encoding the glucocorticoid receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms

Anouk Emadali,^{1,*} Neda Hoghoughi,^{1,*} Samuel Duley,^{1,*} Azadeh Hajmirza,¹ Els Verhoeven,²⁻⁴ Francois-Loic Cosset,^{2,3} Philippe Bertrand,⁵ Christophe Roumier,⁶ Anne Roggy,⁷ Céline Suchaud-Martin,⁸ Martine Chauvet,^{1,8} Sarah Bertrand,¹ Sieme Hamaidia,^{1,8} Sophie Rousseaux,¹ Véronique Josserand,¹ Julie Charles,^{1,9} Isabelle Templier,⁹ Takahiro Maeda,¹⁰ Juliana Bruder-Costa,^{1,11} Laurence Chaperot,^{1,11} Joel Plumas,^{1,11} Marie-Christine Jacob,^{1,12} Thierry Bonnefoix,¹ Sophie Park,¹³ Remy Gressin,^{1,13} Cornelis P. Tensen,¹⁴ Cristina Mecucci,¹⁵ Elizabeth Macintyre,¹⁶ Dominique Leroux,^{1,8} Elisabeth Brambilla,¹ Florence Nguyen-Khac,¹⁷ Isabelle Luquet,¹⁸ Dominique Penther,⁵ Christian Bastard,⁵ Fabrice Jardin,⁵ Christine Lefebvre,^{1,8} Francine Garnache,^{7,†} and Mary B. Callanan^{1,8,†}

¹INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Faculté de Médecine, Université Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France; ²International Center for Infectology Research, Université de Lyon 1, Lyon, France; ³INSERM U1111, CNRS UMR 5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; ⁴INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice, France; ⁵INSERM U918, Département d'Hématologie, Université de Rouen, Centre Henri Becquerel, Rouen, France; ⁶Institut d'Hématologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France; ⁷INSERM U645, Etablissement français du sang, Université de Franche-Comté, Besançon, France; ⁸Laboratoire de Génétique Onco-Hématologique and ⁹Département de Dermatologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Grenoble-Alpes, Grenoble, France; ¹⁰Department of Community Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan; ¹¹Etablissement français du sang Rhône-Alpes, Laboratoire de recherche et développement, Grenoble, France; ¹²Laboratoire d'Immunologie and ¹³Département d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier et Universitaire de Grenoble-Alpes, Grenoble, France; ¹⁴Department of Dermatology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; ¹⁵Department of Medicine, Perugia University, Perugia, Italy; ¹⁶Laboratory of Oncohematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker Enfants-Malades, University Paris Descartes Sorbonne Cité, Institut Necker-Enfants Malades, INSERM U1151, Paris, France; ¹⁷Unité Fonctionnelle de Cytogénétique Hématologique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France; and ¹⁸Laboratoire d'Hématologie, Pôle de biologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

Key Points

- *NR3C1* haploinsufficiency is found in patients with a plasmacytoid dendritic cell neoplasm characterized by very poor clinical outcome.
- Overexpression of *lincRNA-3q* is a consistent feature of malignant cells in these patients and can be abrogated by BET protein inhibition.

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) is a rare and highly aggressive leukemia for which knowledge on disease mechanisms and effective therapies are currently lacking. Only a handful of recurring genetic mutations have been identified and none is specific to BPDCN. In this study, through molecular cloning in an index case that presented a balanced t(3;5)(q21;q31) and molecular cytogenetic analyses in a further 46 cases, we identify monoallelic deletion of *NR3C1* (5q31), encoding the glucocorticoid receptor (GCR), in 13 of 47 (28%) BPDCN patients. Targeted deep sequencing in 36 BPDCN cases, including 10 with *NR3C1* deletion, did not reveal *NR3C1* point mutations or indels. Haploinsufficiency for *NR3C1* defined a subset of BPDCN with lowered GCR expression and extremely poor overall survival ($P = .0006$). Consistent with a role for GCR in tumor suppression, functional analyses coupled with gene expression profiling identified corticoreistance and loss-of-EZH2 function as major downstream consequences of *NR3C1* deletion in BPDCN. Subsequently, more detailed analyses of the t(3;5)(q21;q31) revealed fusion of *NR3C1* to a long noncoding RNA (*lncRNA*) gene (*lincRNA-3q*) that encodes a novel, nuclear, noncoding RNA involved in the regulation of leukemia stem cell programs and G1/S transition, via E2F.

Overexpression of *lincRNA-3q* was a consistent feature of malignant cells and could be abrogated by bromodomain and extraterminal domain (BET) protein inhibition. Taken together, this work points to *NR3C1* as a haploinsufficient tumor suppressor in a subset of BPDCN and identifies BET inhibition, acting at least partially via *lncRNA* blockade, as a novel treatment option in BPDCN. (*Blood*. 2016;127(24):3040-3053)

Introduction

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) is a rare and clinically aggressive disorder that shows dismal prognosis whatever the treatment.¹ Median overall survival is less than 2 years, even with high-dose chemotherapy, although longer-term, albeit short-lived, remissions have been observed in allotransplanted patients.²⁻⁴

BPDCN derives from malignant transformation of plasmacytoid dendritic cell (pDC) precursors⁵⁻⁷ and is currently classified with acute myeloid leukemia (AML) and related precursor neoplasms in the 2008 World Health Organization classification of hematologic malignancies.¹ Tumor cells infiltrate skin, bone marrow, peripheral blood, and

Submitted September 18, 2015; accepted March 25, 2016. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, April 8, 2016; DOI 10.1182/blood-2015-09-671040.

*A.E., N.H., and S.D. contributed equally to this study.

†F.G. and M.B.C. are co-senior authors.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2016 by The American Society of Hematology

lymph nodes and show the characteristic immunophenotypic profile CD4⁺ CD56⁺ HLA-DR^{hi} CD123⁺ lineage (Lin)[−], although atypical profiles are reported.^{8,9}

BPDCN presents heterogeneous genetic features characterized by chromosomal losses and deletions^{10,11} and a mutational landscape that overlaps with other hematologic malignancies without evidence of unique, disease-specific, driver genetic lesions.^{12–14} As in myeloid and lymphoid malignancies, mutations in key epigenetic modifier-encoding genes, such as *TET2*, *ASXL1*, and *EZH2*, have been described in a proportion of BPDCN cases, thus supporting a role for deregulation of epigenetic signaling in disease pathogenesis.^{12–14} Gene expression profiling (GEP), although performed in relatively few cases, has shown a distinctive transcriptional program in BPDCN characterized by predominant expression of genes that are typical of the pDC lineage^{15,16} and evidence of aberrant activation of the NF-κB pathway.¹⁶

Deletion of chromosome 5q, commonly seen in myelodysplastic syndrome (MDS) and AML, is frequent in BPDCN.^{10,11} Deletion 5q (outside of the 5q− syndrome) is associated with increased risk of leukemic transformation in MDS¹⁷ and with very poor prognosis in AML.^{18,19} This is attributed to haploinsufficiency for critical 5q gene(s), which in cooperation with additional signaling networks, drives malignant transformation and clonal evolution in these disorders.^{20–22} In keeping with this, treatments that are effective in 5q-deleted myeloid malignancies have been shown to directly target critical haploinsufficient 5q genes and their signaling networks.²⁰

Based on the latter findings,^{20–22} we hypothesized that similar 5q gene haploinsufficiency mechanisms are likely to operate in BPDCN and that identification of the relevant 5q target genes might lead to new insight into disease biology and therapy. In this setting, we have used molecular cloning coupled with molecular cytogenetics and next-generation sequencing to characterize 5q alterations in BPDCN. Our work points to *NR3C1*, encoding the glucocorticoid receptor (GCR), as a haploinsufficient tumor suppressor in this disorder. *NR3C1* loss defines a subset of highly aggressive BPDCN characterized by a loss-of-*EZH2* function gene expression signature. In addition, we extend previous observations that identified a potential role for epigenetic modifier gene mutations in BPDCN pathogenesis by providing the first evidence of a key role for nuclear long noncoding RNA (lncRNA) deregulation in the pathogenesis of this disorder.

Methods

BPDCN patients and cell lines

BPDCN patients investigated in this study were recruited retrospectively between 2008 and 2014 through 2 French study groups, the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique and the French BPDCN network (identified as cohorts A and B, respectively, in supplemental Table 1, available on the *Blood* Web site). After centralized review of clinical and biological criteria for BPDCN diagnosis,⁸ and on the basis of available cytogenetic/molecular cytogenetic data, 47 patients (median age, 66 years; range, 7–82 years) were enrolled in the current study (supplemental Tables 1–4). All patient data were obtained at diagnosis. All patients provided written informed consent. The study was approved by the institutional review boards of the participating centers. For 2 patients, derived cell lines that displayed the same cytogenetic characteristics as the original patient blasts were used for analyses (unique patient number 1 [UPN 1]: GEN2.2 and UPN 2: CAL-1).^{23,24} BPDCN cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum.^{23,24} Murine stromal cell support was provided for GEN2.2 cells, as previously described.²³

Cytogenetics, FISH, molecular analyses, and aCGH

R-banded karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses, and array comparative genomic hybridization (aCGH) were performed by standard methods, as previously described.^{10,25} All cytogenetic and aCGH data were centrally reviewed by the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique and the French BPDCN network. Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Bacterial artificial chromosome and fosmid probes for FISH mapping are listed in supplemental Table 5. Additional molecular analyses (see below) used reagents given in supplemental Tables 6–12.

NR3C1, *EZH2*, and *ASXL1* mutation screening

For mutation screening of the coding regions of *NR3C1*, a custom, targeted next-generation sequencing panel covering all 9 exons of the *NR3C1* gene (total panel size, 3.3 kb; 31 amplicons) was designed using the Ampliseq Designer software (Thermo Fisher Scientific). Ion Ampliseq DNA libraries were prepared using 10 ng of amplified genomic DNA (for a list of the cases studied and the tissue source of DNA, see supplemental Table 2). Libraries were submitted to emulsion polymerase chain reaction (PCR) with the Ion PGM Hi-Q OneTouch 2 template kit v2. The generated ion sphere particles were enriched with the Ion OneTouch Enrichment System, loaded, and sequenced with the Ion PGM Hi-Q Sequencing 200 Kit on Ion 316 v2 chips (Thermo Fisher Scientific). Torrent Suite version 5.0 software (Thermo Fisher Scientific) was used to perform primary analysis, including signal processing, base calling, sequence alignment to the reference genome (hg19), and generation of binary alignment/map files. Binary alignment/map files were used by Torrent Suite Variant Caller to detect point mutations and short indels using the PGM Somatic Low Stringency profile. Variant Call Format files generated by Variant Caller were annotated using Variant Effect Predictor.²⁶ Samples were considered of sufficient quality when >90% of targeted bases were read with a base call accuracy of at least Q20 (success rate, 100%). The average coverage was 1800× (range, 400–4000×). Variants present in single nucleotide polymorphism databases and absent in COSMIC (version 64) were discarded, as were variants with a predictive SIFT (sorting intolerant from tolerant) score >0.05.²⁶

EZH2 (all coding exons) and *ASXL1* (exon 12) mutation screening was performed in a subset of BPDCN patients (those undergoing GEP; supplemental Table 2) by using primers and PCR cycling conditions, as previously described.^{27,28} Purified PCR products were directly sequenced in both directions, using BigDye Terminator Mix (Applied Biosystems), on the Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer. Data were analyzed with the SeqScanner software version 1.0 (Applied Biosystems).

LD-PCR and fusion transcript cloning

Long-distance PCR (LD-PCR) cloning of the t(3;5)(q21;q31) genomic breakpoint was performed using the Expand Long Template PCR system (Sigma) and LD-PCR primers, TA cloning of PCR products, and sequencing (supplemental Table 6). For RNA analysis, total RNA was prepared by TRIzol reagent, according to the manufacturer's instructions. Rapid amplification of complementary DNA (cDNA) ends (RACE)-PCR (5' and 3') was used to clone the t(3;5)-encoded fusion transcript and was performed using the SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech), according to the manufacturer's instructions. RACE primers are listed in supplemental Table 7. For functional studies, GCR fusion protein (GCR-FP) cDNA was cloned into pcDNA3.1 and pEGFP-C1 and subcloned as a green fluorescent protein (GFP)-tagged isoform into a modified pHIV-SFFV-mRFP-WPRE lentiviral vector, using primers described in supplemental Table 8. CAL-1 cell lines stably expressing GFP alone or GFP-tagged GCR-FP were obtained by lentiviral transduction and cell sorting (BD FACSAria). Successful transduction was confirmed by flow cytometry and western blotting.

RT-qPCR, Northern blotting, and GEP

Total RNA was obtained from whole cells or from subcellular fractions (nuclear and cytoplasmic), reverse transcribed (RT) by using the SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), and subjected to quantitative PCR (qPCR) by using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and

the primers shown in supplemental Table 7, according to the manufacturers' instructions. The *ABL* gene was used as a control for normalization of gene expression data. qPCR was performed on an MX3000P machine (Stratagene). Northern blotting used *NR3C1* cDNA probe (see supplemental Methods and supplemental Table 9 for details). Affymetrix GEP was performed as described previously by using total RNA and Affymetrix U133 2.0 chips.²⁹ GEP data normalization and bioinformatics analysis were performed as described previously (see supplemental Methods for details).²⁹

IHC and western blotting

For GCR expression analysis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue, sections of 3- μ m thickness were stained with an anti-human polyclonal GCR antibody (SC-1003; Santa Cruz Biotechnology; polyclonal E20), at an optimized dilution of 1:800. Immunohistochemistry (IHC) was performed on a Benchmark XT autostainer (Ventana Medical Systems) using standard antigen retrieval (1 hour at 98°C) in Cell Conditioning Solution (CC1; Ventana Medical Systems). Primary antibody was incubated for 1 hour at room temperature, and the signal was visualized by diaminobenzidine with the OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems). Sections were counterstained with hematoxylin. The H-Score method was used for evaluation of the immunostaining by multiplying the intensity of the staining (0, no staining; 1, weak; 2, moderate; and 3, strong staining) by the percentage of the tumor stained. The minimum score was 0 and the maximum was 300.

For western blotting, whole cell lysates, obtained by sonication of cell pellets in Laemmli buffer, were resolved by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes for blotting with anti-N-terminal GCR (polyclonal E-20), anti-GFP (clone B2; Santa Cruz Biotechnology), anti-H3K27me3 (Millipore), anti-histone H3 (Upstate), anti-E2F1 (clone KH95; Santa Cruz Biotechnology), and anti-ACTIN (Sigma) antibodies. After treatment with blocking solution (1 \times phosphate-buffered saline, 8% skimmed milk, and 0.1% Tween 20), membranes were incubated with primary antibody (anti-GCR [0.4 mg/mL] and anti-H3K27me3, anti-histone H3, and anti-ACTIN [0.5 mg/mL] in phosphate-buffered saline, 3% skimmed milk, and 0.1% Tween 20), washed, and incubated with anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin G–horseradish peroxidase (Thermo Fisher Scientific) before incubation in enhanced chemiluminescent SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific). Images were captured using autoradiography films.

Gene silencing

Nontargeting (control; Ctrl), GCR-targeting, and lincRNA-3q-targeting short hairpin RNA (shRNA) sequences were designed using the DSIR (designer of small interfering RNA [siRNA]) algorithm (<http://biodev.cea.fr/DSIR/DSIR.html>).³⁰ Hairpin sequences are provided in supplemental Table 10. Short hairpin sequences were cloned into the pLKO-1 lentiviral vector (Addgene) and packaged, as described previously.³¹ Cell lines stably expressing shCtrl, shGCR, and shlincRNA-3q were established under puromycin selection.

Glucocorticoid response element and E2F reporter assays and RNA interference

Transient transfection assays using the glucocorticoid response element luciferase reporter plasmid (gift from J. Cidlowski, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Durham, NC) were performed in COS7 cells using Lipofectamine (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Transient transfection assays with the E2F reporter system were performed in H1299 cells using X-tremeGENE (Roche) following the manufacturer's instructions. Luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). siRNAs were ordered from Eurogentec (supplemental Table 10) and transfected using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Evaluation of drug sensitivity

For drug sensitivity testing, 5×10^5 cells per milliliter were treated for the desired time and drug dose (dexamethasone at 100 nM or 10 μ M, etoposide at 10 μ M,

and JQ1 at 1 μ M). Dexamethasone was provided by the pharmacy at Grenoble University Hospital. Etoposide was purchased from Sigma. JQ1 was synthesized, as described previously.²⁹ Cell viability was evaluated by AnnexinV/propidium iodide (Beckman Coulter) or propidium iodide staining and flow cytometry analysis (BD LSR II). Specific cell death was calculated as $(\% \text{ drug-induced cell death} - \% \text{ control cell death}) \div (100 - \% \text{ control cell death}) \times 100$, as described previously.³²

ChIP

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were performed as described by Fournier et al²⁵ (native chromatin) or using the Magna ChIP kit (Millipore; cross-linked chromatin), following the manufacturer's instructions. Briefly, all ChIP assays were performed in triplicate in at least 2 independent chromatin preparations. For qPCR analyses of immunoprecipitated chromatin fractions at sequences of interest, a SYBR Green PCR Kit (Applied Biosystems) was used with primer pairs, as listed in supplemental Table 11. The qPCR data obtained on immunoprecipitated fractions were normalized to input chromatin ($\% \text{ Input} = 2^{\Delta\Delta Ct} = 2^{(Ct(\text{Immunoprecipitation}) - Ct(\text{Input}))}$). Background precipitation was evaluated with a mock immunoprecipitation.

Clonogenicity and xenotransplantation assays

Clonogenic cell frequencies were estimated by a method³³ checking that the limiting dilution data do not include false-negative outcomes and conform to the single-hit Poisson model. Statistical differences of clonogenic cell frequency estimates between assays were analyzed by a likelihood ratio test developed for limiting dilution assays.³⁴ Animal studies are described in supplemental Methods.

Statistics

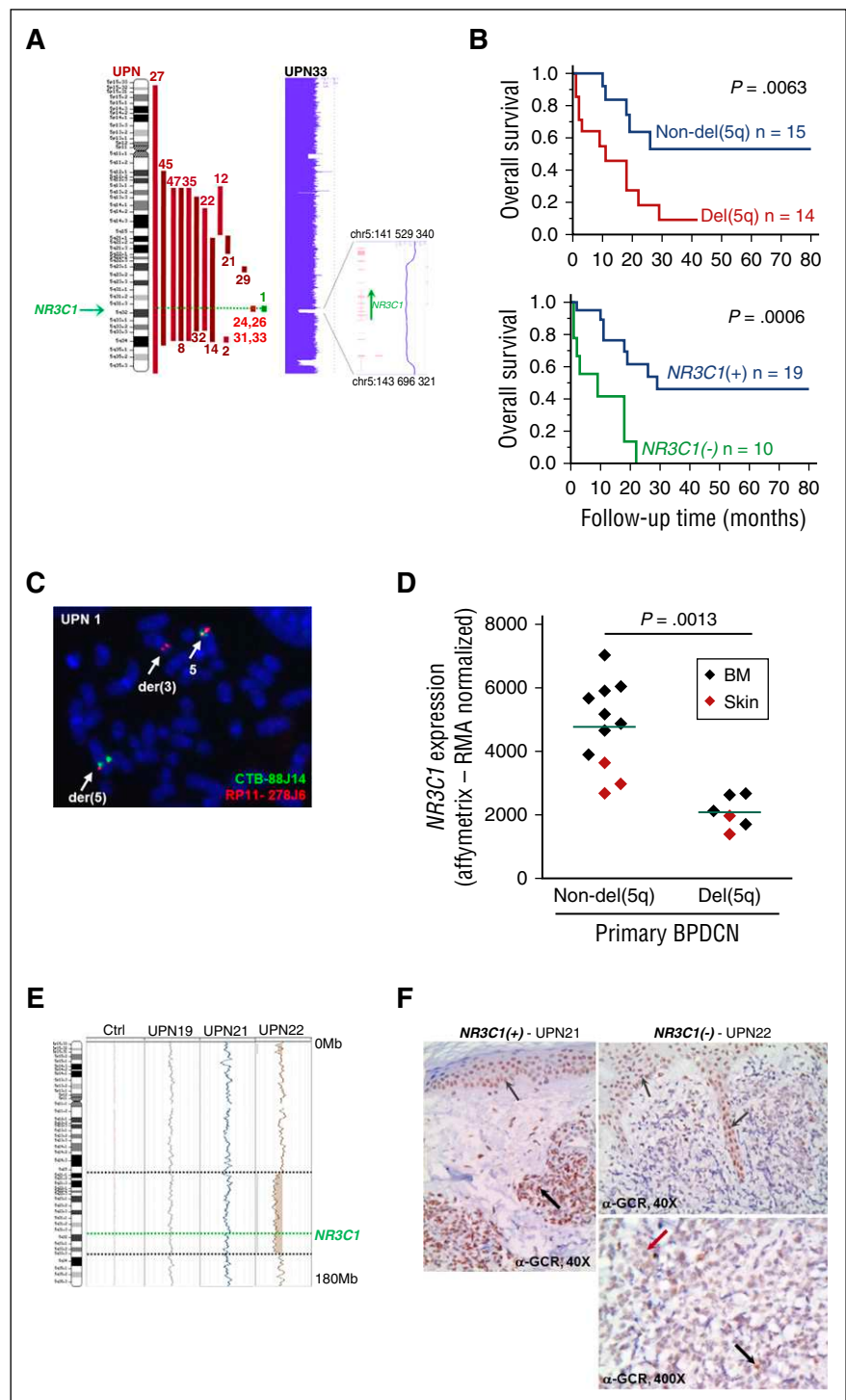
Excel 2010 (Microsoft), JMP 10.0.0 (SAS Institute), Stata/IC 10.1 (StataCorp), and GraphPad (Prism) software programs were used for graphical representations and to perform statistical analysis across all experiments. Survival curves were built according to the Kaplan-Meier method. Comparison of Kaplan-Meier survival estimates was performed using the log-rank test. Univariate and multivariate survival analyses were performed using Cox proportional hazards regression to identify statistically significant predictors of overall survival and to obtain hazard ratio estimates as well as corresponding 95% confidence intervals. Multivariate models were constructed by including all variables with $P < .2$ in univariate analysis. The Wald test was used to assess the significance of variables in models. The Wilcoxon nonparametric method or the 2-sided Student *t* test were used for statistical analysis, as indicated. Histograms represent the average for each group, and error bars represent standard deviation or standard error on the mean, as indicated.

Results

5q Anomalies in BPDCN confer adverse clinical outcome

To uncover 5q-linked disease mechanisms in BPDCN, we screened 47 BPDCN patients at diagnosis for the presence of 5q alterations/chromosome 5 loss, by conventional metaphase karyotyping (39/47 cases), coupled with aCGH (25/47 cases), and/or locus-specific FISH (23/47 cases) when material was available (supplemental Tables 1 and 2; Figure 1). Overall, 5q alterations, including a single case of balanced 5q translocation [UPN 1; t(3;5)(q21;q31); supplemental Figure 1A] and 1 case with chromosome 5 loss, were observed in 17 of 47 patients (36%) (Figure 1A). In agreement with our previous findings,^{10,11} a majority of 5q abnormalities occurred in the context of complex karyotypes, in either founder clones (13 cases) or subclones at diagnosis (4 cases) (supplemental Table 2). Consistent with a role in leukemia initiation and/or clonal evolution, and as seen in other myeloid cancers,

Figure 1. Targeting of the *NR3C1* gene by 5q deletion/translocation in BPDCN. (A) Schematic representation of 5q alterations in BPDCN patients ($n = 17/47$), as indicated (left). aCGH image of case UPN 33 showing focal deletion of the *NR3C1* gene (right). (B) Kaplan-Meier cumulative survival curves in BPDCN according to 5q alteration status (for simplicity, this is labeled del(5q) [UPNs 1, 2, 8, 12, 14, 21, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 35, and 45] and non-del(5q) [UPNs 3, 9, 10, 16-19, 25, 27, 36, 37, and 40-42]; upper) and to *NR3C1* deletion status (UPNs 1, 8, 14, 22, 24, 26, 27, 31, 35, and 45) (lower), determined by FISH or aCGH; $\Delta NR3C1$). P values were determined by log-rank test. (C) FISH analysis of the t(3;5)(q21;q31) in the BPDCN cell line GEN2.2 (UPN 1) with chromosome 5q probes CTB-88J14 (green) and RP11-278J6 (red) (supplemental Table 2). Note a split signal for RP11-278J6 (*NR3C1*) on the der(3) and der(5) chromosomes. (D) Affymetrix-derived *NR3C1* expression in BPDCN patients presenting del(5q) targeting *NR3C1* or not. P value was determined by Wilcoxon test. (E) aCGH image showing 5q/*NR3C1* deletion in DNA from a skin biopsy sample with leukemic infiltrate (UPN 22) compared with control DNA (Ctrl), and analysis in 2 BPDCN cases without 5q/*NR3C1* deletion (UPNs 19 and 21). (F) Overview of immunostaining (diaminobenzidine and hematoxylin) of GCR on BPDCN dermal localization in a del(5q) case: *NR3C1*(+) (left) and a del(5q)/*NR3C1* case: *NR3C1*(-) (upper right). Epidermal squamous cells showing positive nuclear staining are marked with thin gray arrows; leukemia infiltrate cells are marked with thick black arrows. A higher magnification of the clonal infiltrate in dermis of the same case as the upper right image shows mainly negative tumor cells (red arrow) and some positive cells (thick black arrow) (lower right). BM, bone marrow.



the presence of 5q anomalies in BPDCN was associated with very poor prognosis ($P = .0063$) (Figure 1B, top).

Targeting of *NR3C1* by 5q anomalies in BPDCN

As an entry point to identification of pathogenically relevant 5q genes in BPDCN, we next focused our attention on molecular cytogenetic characterization of the balanced t(3;5)(q21;q31) identified in UPN 1 (supplemental Table 2; supplemental Figure 1A).¹¹ Involvement of chromosomal arm 3q was of added interest because 3q aberrations are

known to confer extremely poor prognosis, at least in AML and MDS.^{17-19,35} Remarkably, FISH mapping of the t(3;5)(q21;q31) in UPN 1 metaphases identified the *NR3C1* gene, encoding the GCR, a ligand-dependent transcription factor of the nuclear hormone receptor family,³⁶ as the 5q target gene. Subsequently, aCGH and/or FISH analysis with an *NR3C1*-specific probe in our cohort of BPDCN showed *NR3C1* deletion to occur in 13 of 17 5q-rearranged cases (76%), of which 4 occurred in subclones detected at diagnosis (Figure 1A; supplemental Tables 1 and 2). Strikingly, 1 case with normal cytogenetics (UPN 33) presented a focal, morphologically

cryptic *NR3C1* deletion (chromosome 5:141,529,340 to 143,696,321), thus defining a minimally deleted 5q region in our BPDCN patient series (Figure 1A, right). It is of note that focal deletions of *NR3C1* have previously been implicated in B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL),^{37,38} but not in myeloid malignancies. No further *NR3C1* translocations were identified. Targeted deep sequencing in 36 cases, including 10 of the 13 cases with *NR3C1* translocation/deletion (UPNs 1, 8, 14, 22, 24, 26, 27, 31, 32, 33), did not detect *NR3C1* point mutations or indels (see supplemental Table 12 for *NR3C1* amplicon primers). This finding suggested that haploinsufficiency for *NR3C1* is a pathogenically relevant event in BPDCN with 5q/*NR3C1* alteration. In keeping with this, GEP in bone marrow and skin biopsy tissue from cases with *NR3C1* deletion showed lower *NR3C1* expression in a subset of *NR3C1*-deleted BPDCN cases compared with nondeleted cases (Figure 1D).

We next examined GCR protein expression levels according to *NR3C1* deletion status in leukemia-infiltrated skin biopsy tissue from 2 BPDCN cases, 1 with *NR3C1* deletion (UPN 22) and 1 without (UPN 21) (Figure 1E-F). Material was not available for GCR protein expression analysis in any other cases. Quite strikingly, IHC with the anti-GCR antibody (clone A20) revealed markedly diminished GCR protein levels in the *NR3C1*-deleted case (UPN 22) compared with the nondeleted case (UPN 21; H-Score, 300) (Figure 1F). In the latter, GCR protein expression was high and localized to the nucleus of the leukemia cells, indicating engagement of GCR signaling. BPDCN cells in the *NR3C1* haploinsufficient case appeared mostly negative for GCR immunostaining (H-Score, 0), although we suspect that IHC may not be sufficiently sensitive to detect very low level GCR expression. In the few GCR-positive leukemic cells seen in the *NR3C1*-deleted case (UPN 22), GCR expression was nuclear, indicative of active, nuclear GCR signaling.

Taken together, these results show that *NR3C1* deletion impacts *NR3C1* expression at the RNA and protein levels in BPDCN. Nuclear GCR signaling is engaged in BPDCN and appears attenuated in *NR3C1*-deleted BPDCN.

Haploinsufficiency for *NR3C1* defines a very high risk subset of BPDCN

We next wished to determine the clinical impact of monoallelic *NR3C1* deletion in BPDCN. We first analyzed the impact on overall survival of variables, including 5q/*NR3C1* deletion, in univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models (supplemental Table 3). By univariate analysis, patient age (>66 years) ($P = .03$), lack of allogeneic bone marrow transplant (allo-BMT) ($P = .008$), presence of del(5q) ($P = .013$), and *NR3C1* gene alterations ($P = .004$) were significant hazards for death. Age was significantly linked to allo-BMT ($P < .0001$ by standard χ^2 test), and del(5q) significantly linked to *NR3C1* alterations ($P < .0001$), suggesting that allo-BMT and *NR3C1* alterations, rather than age and del(5q), were the main factors of interest. Accordingly, allo-BMT and *NR3C1* alteration were investigated for their impact on survival by multivariate analysis. Although allo-BMT did not reach statistical significance ($P = .08$), the analysis suggests that lack of allo-BMT and monoallelic loss of *NR3C1* ($P = .022$) are independent factors that negatively impact survival in BPDCN (supplemental Table 3). Thus, haploinsufficiency for *NR3C1* appears to define a very high risk subgroup of BPDCN patients. Of note, none of the 3 chemotherapy regimens was statistically significantly related to favorable or unfavorable outcome in univariate analysis (supplemental Table 3).

Molecular characterization of a novel t(3;5)(q21;q31) in BPDCN reveals fusion of the *NR3C1* gene to a lincRNA-encoding gene in 3q21

To further explore the pathological relevance of *NR3C1* rearrangement in BPDCN, we performed detailed molecular and functional

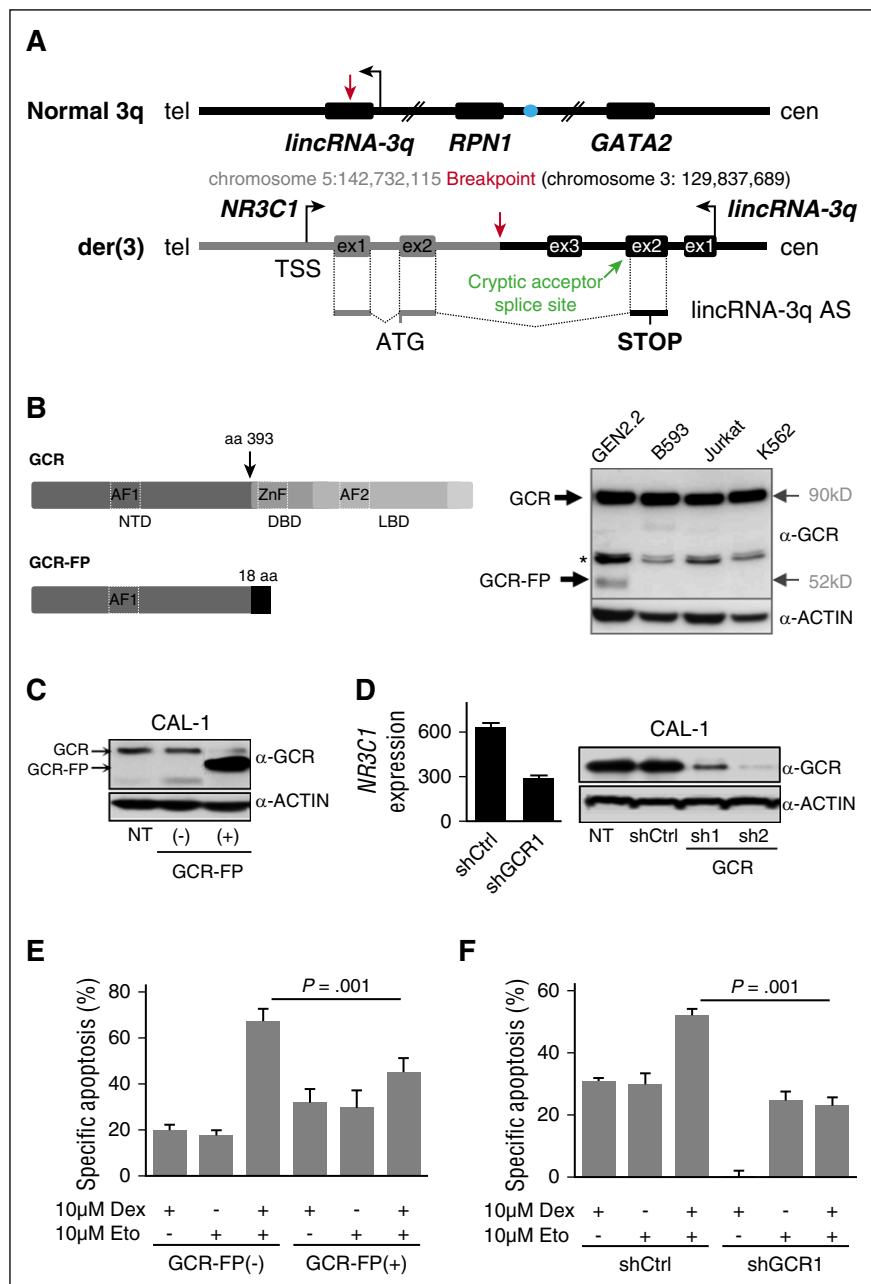
characterization of the t(3;5)(q21;q31) observed in the primary cells and in the derived cell line GEN2.2 of patient UPN 1 (Figure 1C; supplemental Figure 1A; supplemental Table 2). RACE-PCR and sequencing revealed the t(3;5)(q21;q31) to encode a single chimeric transcript comprising exons 1 and 2 of the *NR3C1* gene fused to an antisense sequence deriving from a novel lincRNA gene located in 3q21 (named here, *lincRNA-3q*) (Figure 2A; supplemental Figure 1C-D). LD-PCR genomic breakpoint cloning identified this transcript to result from fusion of *NR3C1* intron 2 (chromosome 5:142,732,115) to *lincRNA-3q* intron 3 on the der(3) chromosome (chromosome 3:129,837,689) (supplemental Figure 1D). No further abnormal transcripts were detectable by Northern blotting across the *NR3C1* gene, thus ruling out *NR3C1* reciprocal fusion transcripts deriving from the der(5) chromosome (supplemental Figure 1B). Sequencing predicted the *NR3C1*-*lincRNA-3q* fusion gene transcript to encode a GCR fusion protein comprising the GCR N-terminal activation domain AF1 (amino acids 1-393) fused to 18 amino acids derived from transcriptional read-through into the *lincRNA-3q* locus (Figure 2B, left). In keeping with this, western blotting in t(3;5)-positive GEN2.2 cells, using an anti-N-terminal GCR antibody (clone E20), detected a single abnormal GCR protein isoform (~52 kDa, hereafter referred to as GCR-FP), in addition to the wild-type GCR (90 kDa) (Figure 2B, right).

NR3C1 translocation/deletion drives altered GCR signaling and drug resistance in BPDCN

NR3C1 gene alterations have been described in a subset of relapsing B-ALL, suggesting a role in therapy resistance.^{37,38} We thus investigated responses to drug therapy in CAL-1 cells after stable overexpression of a GFP-tagged isoform of GCR-FP (CAL-1 GCR-FP[+]; Figure 2C; supplemental Figure 2A-B) or after stable GCR knockdown (CAL-1 shGCR1 and 2; Figure 2D) designed to mimic haploinsufficiency for *NR3C1* as seen in patients compared with control cells (ie, CAL-1 cells expressing GFP alone [CAL-1 GCR-FP(-)] or CAL-1 shCtrl cells, respectively). Strikingly, responses to combination therapy with high-dose synthetic GCR ligand (dexamethasone at 10 μ M) and etoposide (10 μ M) were markedly reduced in CAL-1 GCR-FP-overexpressing cells compared with controls (Figure 2E). Cell death after dexamethasone (10 μ M) or etoposide (10 μ M) treatment alone was unchanged, at least under these conditions (Figure 2E). Similarly, GCR depletion by short hairpin markedly reduced cell death responses to single-agent dexamethasone or to combination therapy by etoposide-dexamethasone compared with controls, but did not affect cell death response to etoposide alone (Figure 2F).

The next step was to analyze more globally the potential impact of GCR haploinsufficiency on ligand-dependent GCR transcriptional regulatory activity in BPDCN. We first used luciferase reporter assays to test the impact of GCR-FP on wild-type GCR activity in the absence (dimethyl sulfoxide) or presence of dexamethasone (Figure 3A). As expected, this revealed GCR-FP dose-dependent attenuation of GCR transcriptional transactivation activity (Figure 3A). We next performed GEP in GCR-FP-overexpressing or shGCR-treated CAL-1 cells (designed to mimic haploinsufficiency; Figure 2D), in the absence (dimethyl sulfoxide) or presence of dexamethasone (100 nM, 6 hours) (Figure 3B). Low-dose, as opposed to high-dose (therapeutic-level) dexamethasone, was used in order to simulate the conditions in which *NR3C1* alterations might be expected to undergo clonal selection in treatment-naïve leukemia cells in vivo (ie, physiological glucocorticoid concentrations). Strikingly, this analysis revealed specific, hormone-dependent deregulation of 2332 (1205 down; 1127 up) and 3205 genes (1456 down; 1749 up) in CAL-1 shGCR and CAL-1 GCR-FP dexamethasone-treated cells, respectively,

Figure 2. The t(3;5)-encoded GCR-lincRNA-3q fusion protein is associated with glucocorticoid resistance. (A) Schematic representation of the genomic organization surrounding the normal 3q and der(3) breakpoint regions, indicating the resulting fusion transcript NR3C1-lincRNA-3q. The blue filled circle denotes the GATA2 superenhancer. In black, 3q sequences. In gray, 5q sequences. The NR3C1-lincRNA-3q fusion transcript likely derives from a splicing event between NR3C1 exon 2 and a cryptic splice acceptor site located in the antisense orientation in lincRNA-3q exon 2 (chromosome 3:129,832,478). (B) Schematic representation of the structure of wild-type GCR (top left) and predicted GCR-FP (bottom left). GCR and ACTIN western blot analyses showing expression of an abnormal GCR isoform (GCR-FP) exclusively in GEN2.2 cells compared with t(3;5)-negative cell lines, as indicated (right); * denotes nonspecific band. (C) Western blot using anti-GCR and anti-ACTIN antibodies in the parent CAL-1 cell line (nontransduced; NT) compared with CAL-1 cells transduced with empty GFP vector (–) or with the GFP-tagged GCR-FP expression vector (+), as indicated (n = 2). (D) Western blot using anti-GCR and anti-ACTIN antibodies in the parent CAL-1 cell line (NT) compared with CAL-1 cells transduced with shCtrl or shGCR (n = 2 independent hairpins, shGCR1 and 2), as indicated (right). Affymetrix NR3C1 messenger RNA expression in shGCR1 compared with shCtrl-transduced cells (experimental haploinsufficiency, n = 3) (left). (E) Evaluation of drug sensitivity of CAL-1 cells overexpressing GCR-FP compared with control CAL-1 cells after 16 hours of treatment with 10 μ M etoposide (Eto), 72 hours of treatment with 10 μ M dexamethasone (Dex), or a combination of both treatments. Specific apoptosis was measured by AnnexinV/propidium iodide staining and flow cytometry, and calculated as follows: (% drug-induced cell death – % control cell death) \div (100 – % control cell death) \times 100. P value determined by Wilcoxon test; n = 3. (F) Evaluation of drug sensitivity of CAL-1 cells shGFP compared with shCtrl as described in panel E. aa, amino acid; AF, activation function domain; cen, centromere; DBD, DNA binding domain; LBD, ligand binding domain; ex, exon; NTD, N-terminal domain; tel, telomere; TSS, transcription start site; ZnF, zinc finger domain.

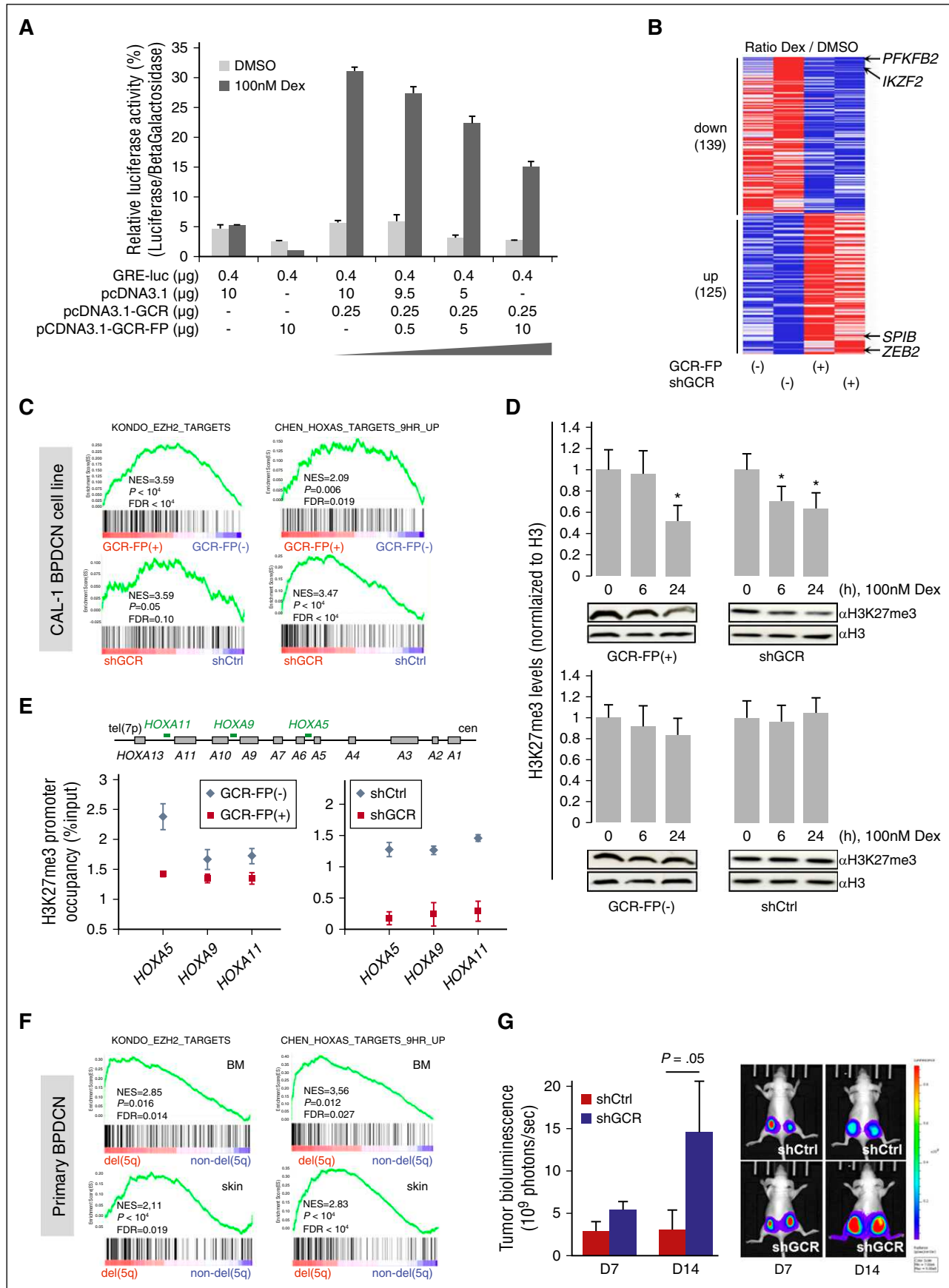


compared with CAL-1 control cells. Further analysis revealed a common subset of 264 deregulated genes (139 down; 125 up) (Figure 3B; supplemental Table 13), which included known GCR target genes such as *PFKB2* (encoding 6-phosphofructo-2-kinase) and genes encoding nuclear factors that have been implicated in normal (IKZF2/Helios) or leukemic (ZEB2) T lymphoid^{39,40} or dendritic cell lineage development (*SPIB*).⁴¹ Supporting the clinical relevance of the latter findings, deregulated expression of *IKZF2*, *ZEB2*, and *SPIB* was also observed by GEP in primary patient cells with *NR3C1* deletion compared with nondeleted control cases (supplemental Figure 3A).

Loss-of-EZH2 function is a hallmark of 5q alterations that target *NR3C1* in BPDCN

To further explore the pathological relevance of 5q alterations targeting *NR3C1* and related gene expression changes in BPDCN, we used

GSEA to identify, in an unbiased manner, common dexamethasone-dependent gene signatures that are abnormally modulated upon overexpression of the t(3;5)-encoded GCR-FP or experimental *NR3C1* haploinsufficiency in CAL-1 BPDCN cells. Consistent with our functional studies (Figure 2E-F), this analysis revealed enrichment of prednisone resistance gene signatures that have previously been described in B-ALL^{42,43} in dexamethasone-treated CAL-1-GCR-FP-expressing cells and CAL-1 shGCR cells compared with controls (supplemental Figure 2C). Of note, 1 of these resistance signatures⁴³ was also enriched in *NR3C1*-deleted primary BPDCN cells compared with nondeleted cases, thus further reinforcing the notion that *NR3C1* deletion contributes to treatment failure in BPDCN, as in B-ALL^{37,38} (supplemental Figure 2C). Strikingly, this analysis also revealed marked enrichment for signatures related to loss-of-EZH2 function in cancer cells, including gene expression programs that are functionally linked to *HOXA* locus derepression in myeloid leukemia^{44,45}



(Figure 3C). This prompted us to examine the impact of attenuated GCR signaling on global H3K27me3 levels in BPDCN. For this, we used CAL-1 cells overexpressing GCR-FP or undergoing GCR knockdown to assess global H3K27me3 levels after low-dose dexamethasone treatment compared with control conditions. Consistent with our GEP experiments, western blot analyses revealed global loss of H3K27me3 under attenuated GCR signaling (Figure 3D; supplemental Figure 3D). Further analysis by site-specific anti-H3K27me3 ChIP confirmed reduced H3K27me3 levels at the *HOXA* locus, a major downstream target of the polycomb-repressive complex 2 (PRC2) complex in the hematopoietic lineage, specifically at the *HOXA5*, *HOXA9*, and *HOXA11B* gene promoters, in dexamethasone-treated GCR-FP overexpressing CAL-1 cells and in CAL-1 shGCR cells compared with controls (Figure 3E). In keeping with the clinical pertinence of these findings, GEP in primary *NR3C1*-deleted BPDCN leukemia cells compared with nondeleted cases from bone marrow (UPNs 32-42) or skin (UPNs 43-47) also identified EZH2 loss-of-function signatures (Figure 3F; supplemental Figure 3B). Genomic DNA sequencing was performed to check whether *ASXL1* and *EZH2* mutations might be responsible for the observed loss-of-EZH2 function signatures. This is important because mutations in these genes have been described in BPDCN.¹⁴ We screened the 2 BPDCN cell lines (UPNs 1 and 2) and the bone marrow or blood-derived DNA from the 12 patients for which GEP was used for GSEA (UPNs 31-42, including 4 cases with *NR3C1* monoallelic loss [UPNs 31-33 and UPN 35]). Sequencing identified 2 BPDCN cases with deleterious *ASXL1* exon 12 mutations (UPNs 34 and 40) (supplemental Table 4; supplemental Figure 3C) and 1 case (UPN 36) with a heterozygous *EZH2* mutation. UPN 40 showed 2 different *ASXL1* mutations (supplemental Table 4). In 5 cases (ie, 3 non-del(5q) [UPNs 38, 39, and 41] and 2 5q/*NR3C1* deletion [UPNs 32 and 33]), the region spanning the G-rich region chromosome 20:31,022,184 to 31,022,744 of *ASXL1* exon 12 could not be fully sequenced because of insufficient DNA. Of note however, mutations in this region appear rare in BPDCN (1/25 reported cases).¹⁴ When GSEA was performed, without the GEP data from the *EZH2* and *ASXL1* mutant cases (UPN 36 and UPNs 34 and 40, respectively), *NR3C1* deletion remained significantly associated with multiple loss-of-EZH2 function signatures (Figure 3F; bone marrow, top; skin, bottom). Although this does not exclude other, yet-to-be-determined factors, in the emergence of the loss-of-EZH2 function signature in our *NR3C1*-deleted BPDCN cases, gene mutations affecting *ASXL1* and *EZH2* are unlikely to be responsible for the observed phenotype. In keeping with the relevance of these findings to BPDCN pathogenesis, knockdown of GCR significantly accelerates leukemia growth in a xenotransplant assay utilizing CAL-1 BPDCN cells (Figure 3G; supplemental Figure 3E-F). Of note, the loss-of-EZH2 function GEP signatures did not include PRC2 factor or H3K27me3 demethylase encoding genes, suggesting that altered PRC2 activity, rather than deregulated expression of individual PRC2 components per se, is responsible for the observed phenotypes. Taken together, these findings

point to the existence of a novel cellular mechanism by which GCR and EZH2 signaling collaborate to reprogram EZH2 targets in leukemia.

***lincRNA-3q* is overexpressed in BPDCN and AML and encodes a nuclear noncoding RNA that regulates cell proliferation and leukemic stem cell gene expression programs**

We next wished to assess the pathological relevance of the lncRNA gene identified at the 3q21 breakpoint in the t(3;5)(q21;q31) observed in BPDCN case UPN 1 (Figure 2A). For this, we first measured expression levels of lincRNA-3q in normal pDC, BPDCN cell lines, and primary BPDCN leukemia samples by RT-qPCR (Figure 4A). This revealed evidence of illegitimate *lincRNA-3q* activation in primary BPDCN cases compared with normal pDC. Deregulation of *lincRNA-3q* was also evident in AML (Figure 4A), B-cell lymphoma, and solid cancers (supplemental Figure 4A-B). In normal tissues, *lincRNA-3q* was predominantly expressed in fetal brain, bone marrow, and testis (supplemental Figure 4A). We next assessed the subcellular localization of lincRNA-3q by cell fractionation and qRT-PCR analysis in CAL-1 and U937 AML cells (Figure 4B). lincRNA-3q was found to be predominantly nuclear, suggestive of a role in chromatin signaling.⁴⁶ Quite strikingly, lincRNA-3q knockdown in CAL-1 and U937 cells induced a G1/S arrest (Figure 4C and supplemental Figure 4C, respectively), without inducing cell death (supplemental Figure 4D). In view of this phenotype, GEP, followed by GSEA, was performed in the same cells (Figure 4D and supplemental Figure 4E, respectively). Short hairpin-mediated lincRNA-3q depletion was associated with differential expression of 371 (174 up; 197 down) and 904 genes (428 up; 476 down) in CAL-1 and U937 cells, respectively, thus suggestive of a cell context-dependent role for lincRNA-3q in both gene activation and repression. Among the lincRNA-3q regulated genes in BPDCN CAL-1 cells were *TCL1B*,⁴⁷ *HOXB4*,⁴⁸ and *TP53INP1*, a tumor suppressor gene⁴⁹ (Figure 4D). Similarly, E2F family members (E2F7 and E2F8) known to negatively regulate E2F transcriptional activity were modulated by lincRNA-3q knockdown in U937 cells⁵⁰ (supplemental Figure 4E). Consistent with G1/S arrest in lincRNA-3q-depleted leukemia cells, E2F-regulated gene expression signatures were markedly reduced upon lincRNA-3q depletion in both CAL-1 and U937 cells compared with controls (Figure 4D and supplemental Figure 4E, respectively), thus suggesting a role for lincRNA-3q in the regulation of E2F transcriptional transactivation functions. In keeping with this, lincRNA-3q depletion by siRNA transient transfection in H1299 cells led to G1/S arrest coincident to markedly reduced E2F activity, as measured by a cyclin E-luciferase reporter assay, in the same cells compared with control conditions (Figure 4E; supplemental Figure 5A-E). Knockdown of lincRNA-3q in CAL-1 and U937 AML cells was found to downregulate normal and/or leukemic hematopoietic stem cell gene expression programs^{48,51} (Figure 4D and supplemental Figure 4E, respectively), suggestive of a role in the normal hematopoietic/leukemic stem cell compartment, which is consistent with high-level

Figure 3. Misregulated GCR and EZH2 signaling as a consequence of *NR3C1* alterations in BPDCN. (A) Luciferase reporter assay for glucocorticoid transcriptional transactivation activity in COS7 cells transduced with empty pcDNA3.1 vector, pcDNA3.1-GCR, and pcDNA3.1-GCR-FP, as indicated, after a 6-hour treatment with either dimethyl sulfoxide (DMSO) or 100 nM dexamethasone (n = 3). (B) Heatmap representation of the common differentially expressed genes among CAL-1-GCR-FP (GCR-FP[+]), CAL-1 control cells (GCR-FP[−]), and shGCR-transduced cells (shGCR[+]) compared with controls (shGCR[−]) after treatment with 100 nM dexamethasone for 6 hours (n = 3 for each group). Black arrows indicate genes cited in the text. (C) GSEA plots showing gene regulatory circuits that are differentially expressed between dexamethasone-treated CAL-1-GCR-FP or shGCR compared with respective control CAL-1 cells (CAL-1-GFP or CAL-1 shCtrl). (D) Western blot analysis and quantification of global H3K27me3 levels in CAL-1-GCR-FP (GCR-FP[+]) and CAL-1 shGCR (upper) and respective CAL-1 control cells (CAL-1 GFP [GCR-FP[−]] and CAL-1 shCtrl) (lower) upon 6-hour or 24-hour treatment with 100 nM dexamethasone (n = 3). (E) ChIP for H3K27me3 followed by qPCR analysis for enrichment on *HOXA* gene promoters, as indicated, in CAL-1-GCR-FP (GCR-FP[+]), CAL-1 shGCR, and respective CAL-1 control cells (CAL-1 GFP [GCR-FP[−]] and CAL-1 shCtrl) treated for 24 hours with 100 nM dexamethasone (n = 3). (F) GSEA plots showing gene regulatory circuits that are differentially expressed between BPDCN patients presenting, or not, del(5q) abnormalities that target *NR3C1* (bone marrow or skin, as indicated; unmutated *EZH2* and *ASXL1* cases only). (G) Tumor bioluminescence (7 and 14 days postinjection) for xenotransplanted nude mice bearing tumors derived from CAL-1 shCtrl and shGCR cell lines (left). P value determined by Wilcoxon test; n = 6 for each group. Bioluminescence imaging for representative mouse (right). D, day; GSEA, gene set enrichment analysis.

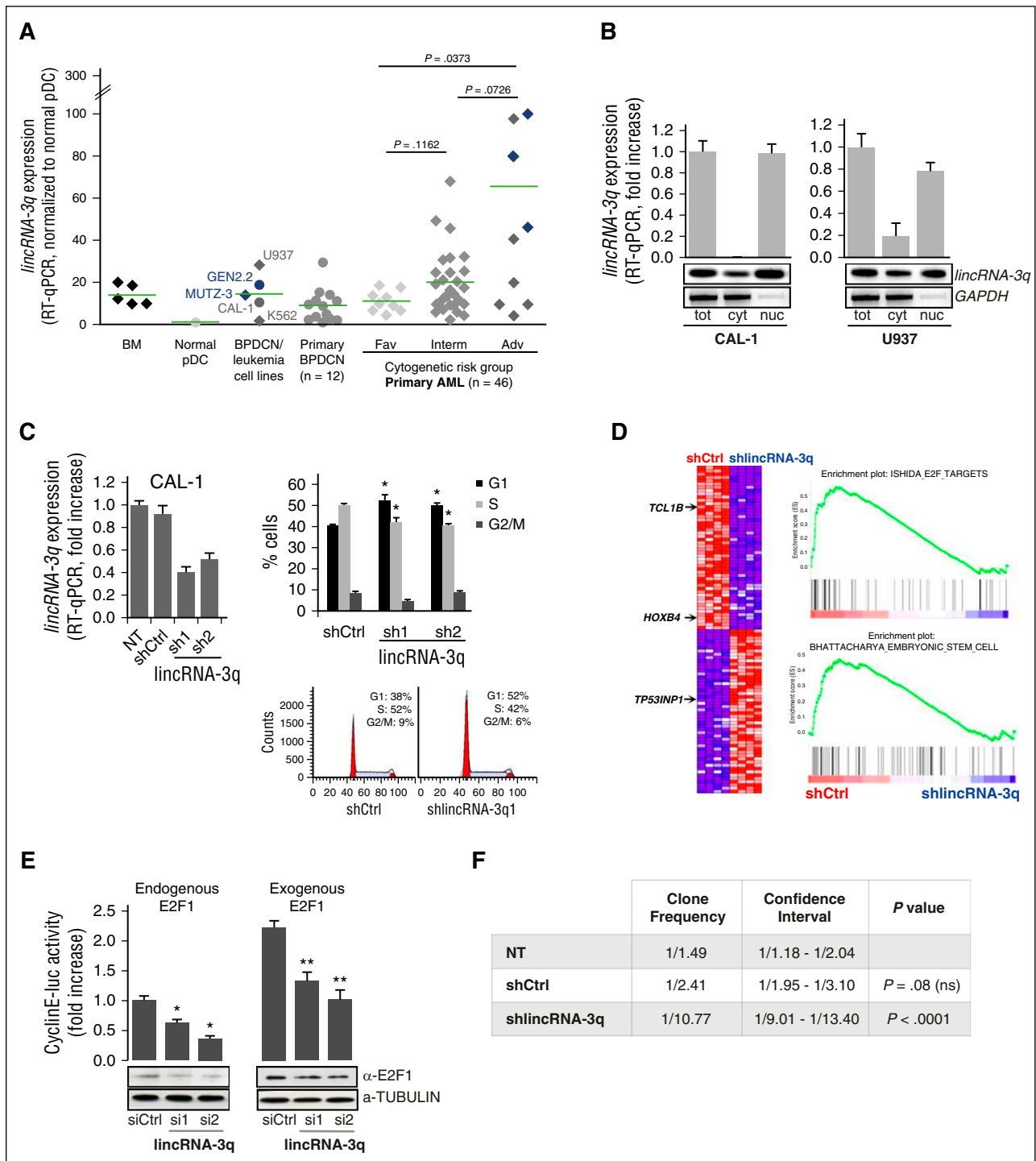


Figure 4. *lincRNA-3q* overexpression in BPDCN and AML drives G1/S and leukemia-driver gene expression programs. (A) RT-qPCR-derived *lincRNA-3q* expression profiles in normal bone marrow; normal pDC; BPDCN (CAL-1, GEN2.2), and chronic myeloid leukemia cell lines (K562); and in BPDCN and AML patient samples. AML patients are classified according to cytogenetic risk group. Cases presenting chromosome 3q abnormalities are identified in blue. (B) RT-qPCR and RT-PCR analysis of the subcellular localization of *lincRNA-3q* in CAL-1 BPDCN cells and U937 AML cells. RNA extracted from whole-cell and subcellular fractions ($n = 2$). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a control. (C) RT-qPCR-derived *lincRNA-3q* expression in CAL-1 cells transfected with control (shCtrl) or *lincRNA-3q*-targeting short hairpin constructs (sh1 and 2) (left). Cell cycle analysis in CAL-1 cells transfected with control (shCtrl) or *lincRNA-3q* sh1 and 2 constructs (upper right). * $P < .05$ by Wilcoxon test; $n = 6$. Representative histogram representation of percentage of cells in cell cycle phases ($n = 4$) (lower right). (D) GSEA plots obtained by comparing gene expression profiles of CAL-1 cells transfected with control (shCtrl) or *lincRNA-3q*-targeting short hairpin (shlincRNA-3q) (right) and associated heatmap ($n = 4$ for each group) (left). Genes mentioned in the text are marked with an arrow. (E) E2F cyclin E-luciferase (luc) reporter assay in H1299 cells transiently transfected with control or siRNA targeting *lincRNA-3q* with or without addition of exogenous E2F1 (100 ng) (upper). * $P < .05$, ** $P < .01$ by Wilcoxon test; $n = 6$. Western blot using anti-E2F1 antibody in H1299 cells transfected with siCtrl or shlincRNA-3q, as indicated ($n = 2$) (lower). (F) Table presenting clone frequency and associated statistics derived from in vitro limiting dilution clonogenicity for CAL-1 either nontransduced (NT) or transfected with control (shCtrl) or *lincRNA-3q*-targeting (shlincRNA-3q) shRNA. Adv, adverse; cyt, cytosolic fraction; Fav, favorable; Interm, intermediate; nuc, nuclear fraction; tot, whole cell extract.

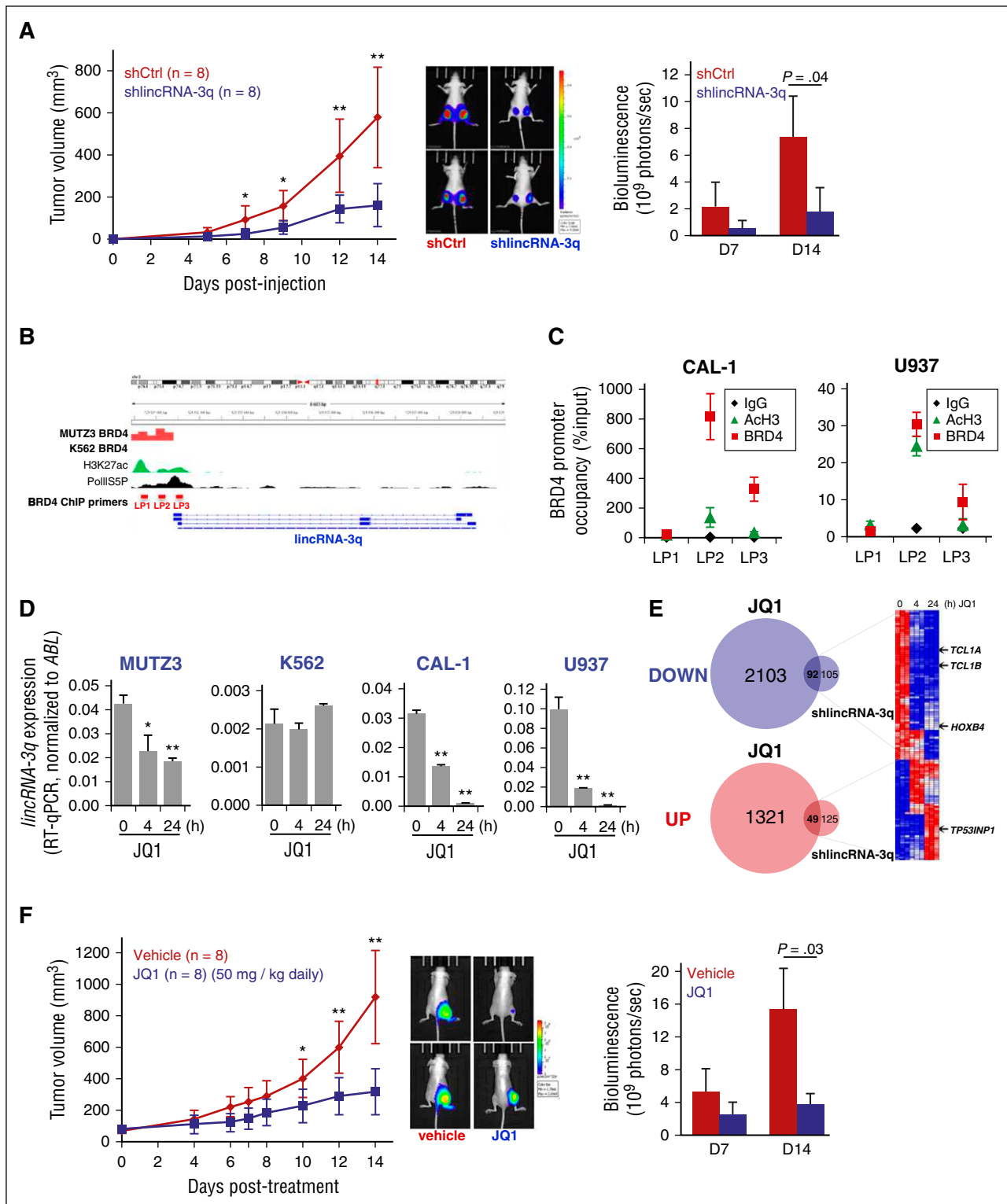


Figure 5. Abrogation of *lincRNA-3q* activity by BET inhibition in BPCDN and AML leukemia cells. (A) Tumor growth kinetics measured in nude mice engrafted with shCtrl or shlincRNA-3q-transduced CAL-1 cells (left); bioluminescence imaging for 2 representative mice (day 14) (middle); and quantification of tumor bioluminescence (7 and 14 days postinjection) for each group (right). *P < .05, **P < .01 by Student t test; n = 8 for each group. (B) Genomic organization of the *lincRNA-3q* locus and BRD4 ChIP-seq analysis (ArrayExpress accession number ERP004614) showing promoter occupancy by BRD4 in MUTZ-3 cell line (3q rearranged AML) compared with K562 cell line (no 3q rearrangement). ENCODE data showing positions of active chromatin marks and phospho-RNA polymerase II (Pol II) binding, as indicated. (C) Anti-BRD4 and anti-AcH3 ChIP at the promoter region of *lincRNA-3q* in CAL-1 and U937 cells, as indicated. (D) RT-qPCR-derived *lincRNA-3q* expression in MUTZ3, K562, U937, and CAL-1 cells treated with 1 μM JQ1 at the time indicated. *P < .05, **P < .01 by Wilcoxon test; n = 3. (E) Venn diagrams (left) and heatmap (right) showing time course of differential gene expression of *lincRNA-3q* targets upon JQ1 treatment in CAL-1, as indicated. (F) Tumor growth kinetics measured in nude mice bearing tumors derived from CAL-1 cell lines after control or JQ1 treatment (left); bioluminescence imaging for 2 representative mice (day 14) (middle); and quantification of tumor bioluminescence (7 and 14 days posttreatment) for each group (right). *P < .05, **P < .01 by Student t test; n = 6 for each group. AcH3, acetylated histone H3; BET, bromodomain and extraterminal domain; Ig, immunoglobulin; LP, lincRNA ChIP Primer.

lincRNA-3q expression in normal bone marrow samples (Figure 4A). This was borne out by in vitro limiting dilution clonogenicity assays in CAL-1 cells, which showed dramatically reduced clonogenic potential upon *lincRNA-3q* depletion compared with controls (Figure 4F). Concordant with this, *lincRNA-3q* knockdown markedly impaired CAL-1 leukemia growth in an in vivo xenotransplantation assay (Figure 5A; supplemental Figure 4F). Thus, *lincRNA-3q* displays features of a bona fide leukemic driver that warrants assessment for therapeutic intervention.

BET inhibition abrogates *lincRNA-3q* overexpression and signaling in BPDCN

Numerous cancer genes,^{29,52,53} including the cancer-related lncRNA gene *HOTAIR*,⁵⁴ have been shown to critically depend on proteins of the BET domain family for their expression. Because high-level overexpression of *lincRNA-3q* was detected in 3q-rearranged AML in which BET proteins (bromodomain-containing protein 4 [BRD4]) have been implicated in deregulation of a critical 3q oncogene (*EVII*), we asked whether BRD4 might also play a role in the regulation of *lincRNA-3q*. To address this question, we interrogated BRD4 ChIP sequencing data sets⁵² derived from MUTZ3 (3q-rearranged AML cell line) compared with K562 (no 3q rearrangement) leukemia cells (ArrayExpress accession number ERP004614). This revealed marked enrichment of BRD4 across the promoter region of the *lincRNA-3q* gene in MUTZ3 cells, but not K562 cells (Figure 5B). Site-specific anti-BRD4 ChIP subsequently revealed BRD4 occupancy of the *lincRNA-3q* promoter in CAL-1 and U937 cells (Figure 5C). In aggregate, this indicated that BRD4 directly regulates *lincRNA-3q* in CAL-1, U937, and MUTZ-3 cells, but not K562 cells (no detectable occupancy of the *lincRNA-3q* promoter by BRD4) and that BET inhibition might constitute a means to reverse abnormal *lincRNA-3q* expression in leukemia cells. In keeping with this, treatment with one such BET inhibitor (JQ1) led to suppression of *lincRNA-3q* levels in a time-dependent manner in MUTZ-3, U937, and CAL-1 BPDCN cells, but not in K562 cells (Figure 5D). In view of this, we next assessed the consequences on global gene expression profiles of JQ1 treatment BET-sensitive *lincRNA-3q*-overexpressing CAL-1 cells compared to those obtained upon depletion of *lincRNA-3q* in the same cells. Quite strikingly, JQ1 treatment in CAL-1 cells modulated a common subset of *lincRNA-3q* targets (92 down; 49 up), including downregulation of known leukemic driver genes (eg, *TCL1A*, *TCL1B*, and *HOXB4*, of which the former 2 are of relevance to BPDCN), as well as enhanced expression of candidate tumor suppressor genes such as *TP53INP1* (Figures 4D and 5E, arrows; supplemental Table 14). As expected for BET inhibition, numerous additional genes not coregulated by *lincRNA-3q* were also identified (Figure 5E). Thus, BET inhibition would be expected to counteract at least some of the oncogenic signaling properties of *lincRNA-3q* in BPDCN and AML. To test this in vivo, we performed a JQ1 treatment protocol in a CAL-1 xenotransplantation assay, which revealed significant suppression of CAL-1 leukemia growth in the treatment (50 mg/kg daily for 14 days) compared with the control arm (vehicle alone) (Figure 5F) at kinetics that closely mirrored those seen in *lincRNA-3q*-depleted compared with control tumors (Figure 5A; supplemental Figure 4F), indicating that BET inhibition is a potent therapeutic strategy in BPDCN.

Discussion

A remarkable finding from our focused genetic screen was the identification of the GCR-encoding gene, *NR3C1*, as a candidate

5q-linked haploinsufficient tumor suppressor in BPDCN. Based on functional studies coupled with GEP and survival analyses in BPDCN patients, we provide novel evidence of a role for *NR3C1* haploinsufficiency in corticoreistance and functional antagonism of gene silencing via EZH2 in a subset of BPDCN. In addition, this report contains the first description of an *NR3C1* fusion gene translocation in human leukemia, thereby raising the necessity for screening for balanced structural aberrations at this locus in BPDCN.

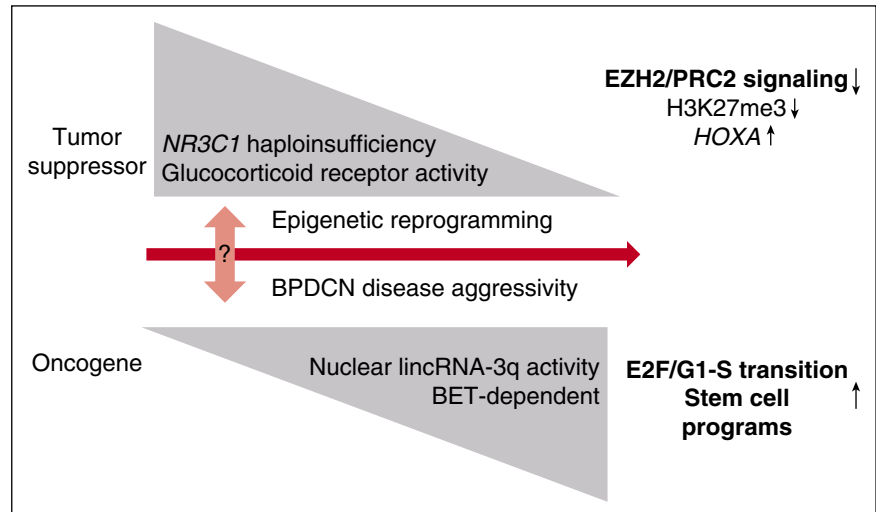
That corticoreistance could be driven by haploinsufficiency for GCR expression in BPDCN is in line with recent findings that identify diminished GCR protein levels as a major determinant of de novo corticoreistance in B-ALL.⁵⁵ *NR3C1* haploinsufficiency in BPDCN is associated with gene expression programs that characterize corticoreistance in B-ALL, suggestive of the existence of common cellular mechanisms for resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in BPDCN and B-ALL.^{42,43} In the specific case of BPDCN, most cases initially respond well clinically to corticotherapy-based regimens, suggesting that glucocorticoid resistance may arise initially at the subclinical level as a consequence of the persistence of residual resistant cells that are haploinsufficient for *NR3C1*. Larger prospective studies will be required to address the relationship, if any, between *NR3C1* haploinsufficiency, residual disease, and the presence of central nervous system involvement at diagnosis which has been implicated in rapid disease recurrence in BPDCN patients.⁵⁶ As proposed recently,⁵⁵ restoring normal GCR levels from the intact *NR3C1* allele might represent a route to overcoming glucocorticoid-based therapy failure in *NR3C1*-haploinsufficient BPDCN. Of note in this context is the finding that thalidomide appears to specifically benefit patients presenting with multiple myeloma and low GCR expression.⁵⁷

The present study has revealed a previously unsuspected connection between GCR signaling and EZH2 activity in human leukemia. EZH2 activity seems to be acutely sensitive to GCR signaling thresholds. Attenuated GCR signaling was associated with profound reductions in H3K27me3, including at the *HOXA* locus, which is a target for derepression in leukemia. We speculate that under conditions in which GCR is limiting, such as in haploinsufficiency for *NR3C1*, GCR-ligand binding elicits dynamic GCR recruitment to high affinity sites in chromatin where either transcriptional activation or repression, depending on the regulatory context of nearby promoters or enhancers, occurs.^{58,59} Enhanced GCR recruitment to high affinity sites would occur at the expense of GCR recruitment to lower-affinity sites across the genome, including at loci that may encode hormone-sensitive, developmentally regulated, and/or lineage-specific transcriptional regulatory factors that are direct PRC2 targets or that control deployment of PRC2 to other critical downstream targets such as the *HOXA* locus in BPDCN. In an alternative, but not mutually exclusive scenario, GCR binding to chromatin increases active marks such as H3K4me2/3 and H3K27ac,⁶⁰ which are known to antagonize H3K27me3 by PRC2.^{61,62}

We propose that hormone-dependent, epigenetic reprogramming is the ultimate consequence of *NR3C1* haploinsufficiency in BPDCN (Figure 6). This hypothesis is supported by our clinical and functional analysis in vitro and in vivo and by reports in other cancers showing that low *NR3C1*/GCR expression is linked to poor prognosis^{57,63,64} and tumor progression.⁶⁵ This postulate is also consistent with analyses showing increased tumor incidence in *Nr3c1* haploinsufficient mice.⁶⁴

A second striking finding in this work resulted from the detailed characterization of the *NR3C1* fusion partner in our index case presenting the balanced t(3;5)(q21;q31). Molecular cloning of this case identified a novel nuclear lncRNA-encoding gene as the partner gene in 3q21. Significantly, ectopic expression of this lncRNA was linked to

Figure 6. A model illustrating how *NR3C1* haploinsufficiency and *lincRNA-3q* misregulation contribute to BPDCN pathogenesis. We postulate that attenuated GCR signaling and *lincRNA-3q* malfunction drive BPDCN disease pathogenesis through epigenetic reprogramming. This is proposed to favor emergence of clinically aggressive disease and predicted to occur progressively by 2 routes. In the first, altered GCR signaling drives a loss-of-EZH2 phenotype that rewires key downstream PRC2 targets (eg, the *HOXA* locus) and drives deregulation of pDC differentiation pathways and treatment resistance in BPDCN. In the second, BET-dependent desilencing of oncogenic lncRNA genes (*lincRNA-3q*) may occur as “collateral damage” downstream of altered GCR and EZH2 activity or through other mechanisms. Abnormal activity of the affected nuclear lncRNA (in this case, *lincRNA-3q*) would engage further rounds of epigenetic reprogramming, leading to misregulation of E2F activity and activation of leukemia stem cell programs.



enrichment of the BET protein BRD4 to the promoter region. BET-inhibitor treatment rapidly abrogated *lincRNA-3q* expression only in leukemia cells showing BRD4 binding to the *lincRNA-3q* promoter, suggestive of a critical role for BET proteins in the maintenance of high-level *lincRNA-3q* expression in BPDCN and AML. We speculate that BRD4 recruitment to the *lincRNA-3q* promoter may depend on the activity of upstream (oncogenic) transcription factors, including possibly the GCR itself, that direct BRD4 to the *lincRNA-3q* promoter region or to neighboring “superenhancers.” The latter are known to mediate long-range dysregulation of key oncogenes in hematologic cancers⁵² and to coordinate activity of key hematopoietic transcription factors in leukemia.⁶⁶ Alternatively, disruption of BRD4 interaction with transcription and elongation factors (eg, polymerase II, positive transcription elongation factor b, Mediator, and Activator) may be part of the mechanism by which JQ1 inhibits *lincRNA-3q* expression. Finally, intrinsic histone acetylase activity of BRD4 itself may play a role.⁶⁷ Our findings indicate that lncRNA function constitutes a novel BET-inhibitor target in human leukemia.

In conclusion, our focused, functional genomics analysis has identified attenuated GCR signaling and unscheduled activation of a novel nuclear lncRNA as important drivers of deregulated epigenetic signaling, treatment resistance, and malignant reprogramming in the dendritic cell lineage (Figure 6). Further studies will be required to fully leverage these findings for treatment innovation in BPDCN and potentially other myeloid and lymphoid cancers that share biological features with this disease. One avenue of investigation is BET protein inhibition.

Acknowledgments

The authors thank members of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique for enrollment of BPDCN cases and for centralized review of karyotype and FISH data; Veronique Pantesco at the Microarray Core Facility of the Institute of Research on Biotherapy, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, INSERM Université Montpellier 1, for performing Affymetrix microarrays; Amandine Chatagnon for advice on next-generation sequencing (NGS), NGS core facility Grenoble University Hospital; Nicolas Lemaître of the Plateforme de Pathologie

Moléculaire in situ, Grenoble University Hospital, for IHC analysis; Céline Villenet, Frédéric Leprêtre, and Martin Figeac of the Plateforme de génomique fonctionnelle et structurale, Université de Lille, for performing and analyzing aCGH; Mylene Pezet and Alexandra Debernardi for expert advice on flow cytometry and bioinformatics, respectively (Flow cytometry and EpiMed core facilities, INSERM U1209, CNRS 5309, Université Grenoble Alpes); Beatrice Eymin for providing the E2F activity reporter system; Patricia Betton-Fraisse and staff in the cytogenetics and molecular genetics laboratory and at the Centre de Ressources Biologiques–Grenoble University Hospital for additional technical assistance; André Verdel, Ramin Shiekhata, Saadi Khochbin, Carlo Petosa, Alexandra Traverse-Glehen, and Tony Petrella for helpful discussions during the course of this work.

This study was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (comités de l’Isère et de la Haute Savoie) (M.B.C.) and by the French Ministry for Higher Education and Research and the Société Française d’Hématologie (N.H.; doctoral funding). Additional funding in the M.B.C. laboratory is from the Institut National du Cancer “Epigénétique et Cancer Programme.” NGS diagnostics in oncology/hematology at Grenoble University Hospital is funded through the Institut National du Cancer “NGS à visé diagnostique” program via the “Plateforme de génétique moléculaire des cancers” of Grenoble Hospital (P. Hainaut).

Authorship

Contributions: A.E. analyzed the data and jointly coordinated the research; N.H., S.D., A.H., S.B., S.H., M.C., and J.B.-C. performed all molecular and cell biology experiments and analyzed the data; C.S.-M. performed the targeted deep sequencing; E.B. interpreted the IHC and pathology; V.J. performed the bioluminescence imaging in vivo and analyzed the data; E.V. and F.-L.C. provided advice on the lentiviral constructs, supplied all lentiviral stocks, and analyzed the data; T.B. coordinated the flow cytometry and the limiting dilution analysis and performed the patient survival analysis; S.R. performed the bioinformatics analysis; P.B., C.R., A.R., J.C., I.T., T.M., L.C., J.P., M.-C.J., S.P., R.G., C.P.T., C.M., E.M., D.L., F.N.-K., I.L., D.P., C.B., F.J., C.L., and F.G. provided

the patient samples, clinical and molecular cytogenetic/transcriptome data, and expert analysis on BPDCN (through the French BPDCN network and Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique); and M.B.C. conceived and coordinated the research, analyzed the data, and wrote the paper. All authors contributed to manuscript preparation, writing, and final approval.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Mary B. Callanan, Centre de Recherche, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, Site Santé, IAB, BP 170, La Tronche, 38042 Grenoble Cedex 9, France; e-mail: mary.callanan@univ-grenoble-alpes.fr.

References

- Fachetti F, Jones DM, Petrella T. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. In: Press W, ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon, France: IARC; 2008:145-147.
- Feuillard J, Jacob MC, Valensi F, et al. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood*. 2002;99(5):1556-1563.
- Ramanathan M, Cerny J, Yu H, Woda BA, Nath R. A combination treatment approach and cord blood stem cell transplant for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Haematologica*. 2013; 98(3):e36.
- Roos-Weil D, Dietrich S, Boumendil A, et al; European Group for Blood and Marrow Transplantation Lymphoma, Pediatric Diseases, and Acute Leukemia Working Parties. Stem cell transplantation can provide durable disease control in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2013;121(3):440-446.
- Chaperot L, Bendriss N, Manches O, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2001;97(10): 3210-3217.
- Osaki Y, Yokohama A, Saito A, et al. Characterization of CD56+ dendritic-like cells: a normal counterpart of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm? *PLoS One*. 2013;8(11): e81722.
- Petrella T, Comeau MR, Maynadié M, et al. 'Agranular CD4+ CD56+ hematodermic neoplasm' (blastic NK-cell lymphoma) originates from a population of CD56+ precursor cells related to plasmacytoid monocytes. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(7):852-862.
- Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, et al; GOELAMS and GEIL study. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;145(5):624-636.
- Marafioti T, Paterson JC, Ballabio E, et al. Novel markers of normal and neoplastic human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2008;111(7): 3778-3792.
- Jardin F, Callanan M, Penther D, et al. Recurrent genomic aberrations combined with deletions of various tumour suppressor genes may deregulate the G1/S transition in CD4+CD56+ hematodermic neoplasms and contribute to the aggressiveness of the disease. *Leukemia*. 2009; 23(4):698-707.
- Leroux D, Mugneret F, Callanan M, et al. CD4(+), CD56(+) DC2 acute leukemia is characterized by recurrent clonal chromosomal changes affecting 6 major targets: a study of 21 cases by the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood*. 2002;99(11):4154-4159.
- Alayed K, Patel KP, Konoplev S, et al. TET2 mutations, myelodysplastic features, and a distinct immunoprofile characterize blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in the bone marrow. *Am J Hematol*. 2013;88(12):1055-1061.
- Jardin F, Ruminy P, Parmentier F, et al. TET2 and TP53 mutations are frequently observed in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Br J Haematol*. 2011;153(3):413-416.
- Menezes J, Acquadro F, Wiseman M, et al. Exome sequencing reveals novel and recurrent mutations with clinical impact in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Leukemia*. 2014;28(4):823-829.
- Dijkman R, van Doorn R, Suzhai K, Willemze R, Vermeer MH, Tensen CP. Gene-expression profiling and array-based CGH classify CD4+CD56+ hematodermic neoplasm and cutaneous myelomonocytic leukemia as distinct disease entities. *Blood*. 2007;109(4):1720-1727.
- Sapienza MR, Fuligni F, Agostinelli C, et al; AIRC 5xMille consortium 'Genetics-driven targeted management of lymphoid malignancies' and the Italian Registry on Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. Molecular profiling of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm reveals a unique pattern and suggests selective sensitivity to NF- κ B pathway inhibition. *Leukemia*. 2014; 28(8):1606-1616.
- Jerez A, Gondek LP, Jankowska AM, et al. Topography, clinical, and genomic correlates of 5q myeloid malignancies revisited. *J Clin Oncol*. 2012;30(12):1343-1349.
- Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al; Medical Research Council Adult Leukemia Working Party. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001;98(5): 1312-1320.
- Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al; Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100(13):4325-4336.
- Krönke J, Fink EC, Hollenbach PW, et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature*. 2015;523(7559):183-188.
- Schneider RK, Ademà V, Heckl D, et al. Role of casein kinase 1A1 in the biology and targeted therapy of del(5q) MDS. *Cancer Cell*. 2014;26(4): 509-520.
- Varney ME, Niederkorn M, Konno H, et al. Loss of Tifab, a del(5q) MDS gene, alters hematopoiesis through derepression of Toll-like receptor-TRAF6 signaling. *J Exp Med*. 2015;212(11):1967-1985.
- Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2006;176(1):248-255.
- Maeda T, Murata K, Fukushima T, et al. A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2005;81(2): 148-154.
- Fournier A, McLeer-Florin A, Lefebvre C, et al. 1q12 Chromosome translocations form aberrant heterochromatic foci associated with changes in nuclear architecture and gene expression in B cell lymphoma. *EMBO Mol Med*. 2010;2(5):159-171.
- McLaren W, Pritchard B, Rios D, Chen Y, Flicek P, Cunningham F. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics*. 2010;26(16): 2069-2070.
- Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010; 42(8):722-726.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009; 145(6):788-800.
- Emadali A, Rousseaux S, Bruder-Costa J, et al. Identification of a novel BET bromodomain inhibitor-sensitive, gene regulatory circuit that controls Rituximab response and tumour growth in aggressive lymphoid cancers. *EMBO Mol Med*. 2013;5(8):1180-1195.
- Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, Vandenbrouck Y. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:520.
- Lévy C, Frecha C, Costa C, et al. Lentiviral vectors and transduction of human cancer B cells. *Blood*. 2010;116(3):498-500, author reply 500.
- Lajmanovich A, Ribeyron JB, Florin A, et al. Identification, characterisation and regulation by CD40 activation of novel CD95 splice variants in CD95-apoptosis-resistant, human, B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Cell Res*. 2009; 315(19):3281-3293.
- Bonnefoix T, Callanan M. Accurate hematopoietic stem cell frequency estimates by fitting multicell Poisson models substituting to the single-hit Poisson model in limiting dilution transplantation assays. *Blood*. 2010;116(14):2472-2475.
- Hu Y, Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods*. 2009;347(1-2):70-78.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354-365.
- Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010;75(1):1-12.
- Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2008; 322(5906):1377-1380.
- Kuster L, Grausenburger R, Fuka G, et al. ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood*. 2011;117(9):2658-2667.
- Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(3): 242-252.
- Goossens S, Radaelli E, Blanchet O, et al. ZEB2 drives immature T-cell lymphoblastic leukaemia

- development via enhanced tumour-initiating potential and IL-7 receptor signalling. *Nat Commun.* 2015;6:5794.
41. Schotte R, Nagasawa M, Weijer K, Spits H, Blom B. The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J Exp Med.* 2004;200(11):1503-1509.
 42. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med.* 2004;351(6):533-542.
 43. Rhein P, Scheid S, Ratei R, et al. Gene expression shift towards normal B cells, decreased proliferative capacity and distinct surface receptors characterize leukemic blasts persisting during induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2007;21(5):897-905.
 44. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet.* 2008;40(6):741-750.
 45. Takeda A, Goolsby C, Yaseen NR. NUP98-HOXA9 induces long-term proliferation and blocks differentiation of primary human CD34+ hematopoietic cells. *Cancer Res.* 2006;66(13):6628-6637.
 46. Ulitsky I, Bartel DP. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell.* 2013;154(1):26-46.
 47. Hashimoto M, Suizu F, Tokuyama W, et al. Protooncogene TCL1b functions as an Akt kinase co-activator that exhibits oncogenic potency in vivo. *Oncogenesis.* 2013;2:e70.
 48. Wang Z, Iwasaki M, Ficara F, et al. GSK-3 promotes conditional association of CREB and its coactivators with MEIS1 to facilitate HOX-mediated transcription and oncogenesis. *Cancer Cell.* 2010;17(6):597-608.
 49. Chaluvaly-Raghavan P, Zhang F, Pradeep S, et al. Copy number gain of hsa-miR-569 at 3q26.2 leads to loss of TP53INP1 and aggressiveness of epithelial cancers. *Cancer Cell.* 2014;26(6):863-879.
 50. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(11):785-797.
 51. Georgantas RW III, Tanadve V, Malehorn M, et al. Microarray and serial analysis of gene expression analyses identify known and novel transcripts overexpressed in hematopoietic stem cells. *Cancer Res.* 2004;64(13):4434-4441.
 52. Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, et al. A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in leukemia. *Cell.* 2014;157(2):369-381.
 53. Lovén J, Hoke HA, Lin CY, et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell.* 2013;153(2):320-334.
 54. Pastori C, Kapranov P, Penas C, et al. The bromodomain protein BRD4 controls HOTAIR, a long noncoding RNA essential for glioblastoma proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(27):8326-8331.
 55. Paugh SW, Bonten EJ, Savic D, et al. NALP3 inflammasome upregulation and CASP1 cleavage of the glucocorticoid receptor cause glucocorticoid resistance in leukemia cells. *Nat Genet.* 2015;47(6):607-614.
 56. Martín-Martín L, Almeida J, Pomares H, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm frequently shows occult central nervous system involvement at diagnosis and benefits from intrathecal therapy [published online ahead of print January 31, 2016]. *Oncotarget.*
 57. Heuck CJ, Szymonifka J, Hansen E, et al. Thalidomide in total therapy 2 overcomes inferior prognosis of myeloma with low expression of the glucocorticoid receptor gene NR3C1. *Clin Cancer Res.* 2012;18(19):5499-5506.
 58. John S, Sabo PJ, Thurman RE, et al. Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat Genet.* 2011;43(3):264-268.
 59. Nixon M, Andrew R, Chapman KE. It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions. *Steroids.* 2013;78(1):59-68.
 60. Wu JN, Pinello L, Yissachar E, Wischhusen JW, Yuan GC, Roberts CW. Functionally distinct patterns of nucleosome remodeling at enhancers in glucocorticoid-treated acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8:53.
 61. Schmitges FW, Prusty AB, Faty M, et al. Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Mol Cell.* 2011;42(3):330-341.
 62. Tie F, Banerjee R, Stratton CA, et al. CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. *Development.* 2009;136(18):3131-3141.
 63. Pan D, Kocherginsky M, Conzen SD. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2011;71(20):6360-6370.
 64. Matthews LC, Berry AA, Morgan DJ, et al. Glucocorticoid receptor regulates accurate chromosome segregation and is associated with malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(17):5479-5484.
 65. Yemelyanov A, Czwornog J, Chebotaev D, et al. Tumor suppressor activity of glucocorticoid receptor in the prostate. *Oncogene.* 2007;26(13):1885-1896.
 66. Roe JS, Mercan F, Rivera K, Pappin DJ, Vakoc CR. BET bromodomain inhibition suppresses the function of hematopoietic transcription factors in acute myeloid leukemia. *Mol Cell.* 2015;58(6):1028-1039.
 67. Devaiah BN, Case-Borden C, Geggion A, et al. BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin [published online ahead of print May 9, 2016]. *Nat Struct Mol Biol.* doi:10.1038/nsmb.3228.



2016 127: 3040-3053

doi:10.1182/blood-2015-09-671040 originally published
online April 8, 2016

Haploinsufficiency for *NR3C1*, the gene encoding the glucocorticoid receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms

Anouk Emadali, Neda Hoghoughi, Samuel Duley, Azadeh Hajmirza, Els Verhoeyen, Francois-Loic Cosset, Philippe Bertrand, Christophe Roumier, Anne Roggy, Céline Suchaud-Martin, Martine Chauvet, Sarah Bertrand, Sieme Hamaidia, Sophie Rousseaux, Véronique Josserand, Julie Charles, Isabelle Templier, Takahiro Maeda, Juliana Bruder-Costa, Laurence Chaperot, Joel Plumas, Marie-Christine Jacob, Thierry Bonnefoix, Sophie Park, Remy Gressin, Cornelis P. Tensen, Cristina Mecucci, Elizabeth Macintyre, Dominique Leroux, Elisabeth Brambilla, Florence Nguyen-Khac, Isabelle Luquet, Dominique Penther, Christian Bastard, Fabrice Jardin, Christine Lefebvre, Francine Garnache and Mary B. Callanan

Updated information and services can be found at:

<http://www.bloodjournal.org/content/127/24/3040.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Myeloid Neoplasia](#) (1689 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml>

3. Annexe 3 : Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt.

Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt

Jonathan Gaucher¹, Fayçal Boussouar¹,
Emilie Montellier¹, Sandrine Curtet¹,
Thierry Buchou¹, Sarah Bertrand¹,
Patrick Hery², Sylvie Jounier²,
Arnaud Depaux², Anne-Laure Vitte¹,
Philippe Guardiola³, Karin Pernet⁴,
Alexandra Debernardi¹, Fabrice Lopez⁵,
Hélène Holota⁵, Jean Imbert⁵,
Debra J Wolgemuth⁶, Matthieu Gérard²,
Sophie Rousseaux^{1,*} and Saadi Khochbin^{1,*}

¹INSERM, U823, Université Joseph Fourier—Grenoble 1, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France, ²CEA, iBiTec-S, Gif-sur-Yvette, France, ³INSERM, U892, Centre de Recherche sur le Cancer Nantes Angers et UMR_S 892, Université d'Angers, Plateforme SNP, Transcriptome and Epigénomique, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France, ⁴INSERM U836, Université Joseph Fourier, Grenoble Institute of Neuroscience, Grenoble, France, ⁵INSERM UMR_S 1090, TGML/TAGC, Aix-Marseille Université, Marseille, France and ⁶Department of Genetics and Development and Obstetrics and Gynecology, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA

Male germ cell differentiation is a highly regulated multi-step process initiated by the commitment of progenitor cells into meiosis and characterized by major chromatin reorganizations in haploid spermatids. We report here that a single member of the double bromodomain BET factors, Brdt, is a master regulator of both meiotic divisions and post-meiotic genome repackaging. Upon its activation at the onset of meiosis, Brdt drives and determines the developmental timing of a testis-specific gene expression program. In meiotic and post-meiotic cells, Brdt initiates a genuine histone acetylation-guided programming of the genome by activating essential genes and repressing a 'progenitor cells' gene expression program. At post-meiotic stages, a global chromatin hyperacetylation gives the signal for Brdt's first bromodomain to direct the genome-wide replacement of histones by transition proteins. Brdt is therefore a unique and essential regulator of male germ cell differentiation, which, by using various domains in a developmentally controlled manner, first drives a specific spermatogenic gene expression program, and later controls the tight packaging of the male genome.

The EMBO Journal (2012) 31, 3809–3820. doi:10.1038/

emboj.2012.233; Published online 24 August 2012

Subject Categories: chromatin & transcription; differentiation & death

Keywords: brd4; bromodomain inhibitor; histone variants; infertility; JQ1

*Corresponding authors. S Rousseaux or S Khochbin, INSERM, U823, Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Institut Albert Bonniot, Grenoble F-38700, France. Tel.: +33 4 76 54 95 83; Fax: +33 4 76 54 95 95; E-mail: sophie.rousseau@ujf-grenoble.fr or Khochbin@ujf-grenoble.fr

Received: 13 June 2012; accepted: 10 August 2012; published online: 24 August 2012

Introduction

With the recent availability of specific bromodomain inhibitors, the highly conserved double bromodomain factors of the BET family (Florence and Faller, 2001; Sanchez and Zhou, 2009) have become promising targets, especially in anticancer therapies (Muller *et al.*, 2011). A precise understanding of their diverse activities is essential for a rational targeting of their functions. In this regard, Brdt, a BET member with a restricted expression in male germ cells, is a prototype of choice, since spermatogenesis involves very specific gene expression patterns (Sassone-Corsi, 2002), as well as major reorganization of chromatin (Gaucher *et al.*, 2010). Indeed, one of the most dramatic examples of chromatin remodelling takes place during the post-meiotic phases, when an almost genome-wide histone removal occurs, associated with the assembly of new DNA-packaging structures formed by non-histone proteins (Rousseaux *et al.*, 2008). Since a correlation between histone hyperacetylation and histone removal had been observed in many organisms (Govin *et al.*, 2004), we looked for bromodomain-containing proteins specifically expressed in male germ cells as potentially interesting candidate factors capable of establishing a functional link between these two events. An *in silico* search led to the identification of the double bromodomain protein, Brdt, with a testis-specific pattern of expression, as a potentially important factor acting on acetylated chromatin in post-meiotic cells (Pivot-Pajot *et al.*, 2003). This idea received strong support from our subsequent structural studies, which revealed the unusual capacity of its bromodomains to recognize a defined combination of acetylated histones. In particular, Brdt's first bromodomain, BD1, binds histone H4 only if a simultaneous acetylation of H4K5 and H5K8 occurs (Moriniere *et al.*, 2009). Since acetylation of both H4K5 and H4K8 is a characteristic of hyperacetylated H4 (Zhang *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2007), Brdt was also identified as the first factor specific for hyperacetylated H4. Interestingly, this property of Brdt to recognize hyperacetylated H4 was confirmed *in vivo* independently, in living cells, in studies using a particular Brdt-H4 FRET probe (Sasaki *et al.*, 2009). This hyperacetylation-dependent activity of Brdt allowed us to predict its action precisely when histone hyperacetylation occurs, at the time of histone replacement by transition proteins (TPs) (Moriniere *et al.*, 2009). Another observation supporting this prediction was that male mice expressing Brdt deleted of its BD1 showed defective spermatogenesis (Shang *et al.*, 2007), with abnormalities appearing in post-meiotic cells exactly when spermatids begin their elongation and exchange their histones for TPs.

To unravel the functions of Brdt, we investigated spermatogenesis in three mouse models, including Brdt KO mice, where the protein is totally absent, and mice expressing a non-functional or a partially functional protein. This work enabled us to demonstrate that Brdt is one of the most critical

factors involved in male genome programming in a domain-specific manner, both in meiotic and in haploid cells.

Altogether, we provide here the first thorough molecular analysis of the activity of a BET factor in its physiological context and shed light on its context and domain-dependent activity.

Results

Brdt gene activation at the onset of meiosis

As a first step towards the understanding of *Brdt*'s function, its expression during spermatogenic differentiation was determined at the mRNA and protein levels during the first wave of spermatogenesis, as well as in adult mouse testes. First, RNA extracted from pre-pubertal and adult mouse testes at time points corresponding to defined steps of spermatogenesis was used to monitor the presence of *Brdt* mRNA. Figure 1A shows that the first detectable accumulation of *Brdt* mRNA corresponds to a particular period when

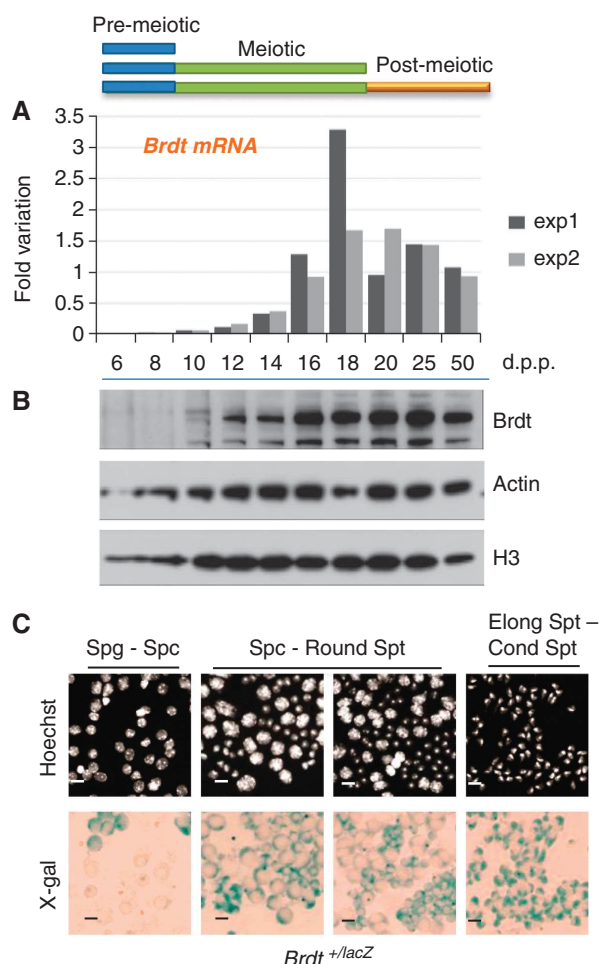


Figure 1 *Brdt* is activated at the onset of meiosis. The expression of *Brdt*/*Brdt* was analysed either by RT-qPCR (A) or by western blots (B). The histograms represent the values of biological duplicates (normalized with respect to *Actin* as a control gene and to *Brdt* mean expression in 50-day-old wt testes). β -Galactosidase activity, driven by *Brdt* gene promoter, was assessed in seminiferous tubules sections (C, lower panels: 'X-gal'). The corresponding sections were stained by Hoechst (C, upper panels: 'Hoechst'). Scale bars, 10 μ m. Figure source data can be found with the Supplementary data.

type B spermatogonia give rise to early meiotic cells (pre-leptotene, leptotene and zygotene) at 10–12 days post partum (d.p.p.), producing a clearly detectable protein at 12 d.p.p. (Figure 1B). The activity of the *Brdt* promoter was visualized using a mouse strain driving the expression of the *lacZ* gene under *Brdt* gene promoter (*Brdt*^{+/lacZ}). Sections of seminiferous tubules of adult mouse testes were stained for β -galactosidase activity and the results confirmed both the absence of *Brdt* expression in spermatogonia and its expression in spermatogenic cells at later stages (Figure 1C; Supplementary Figure S1). Hence, according to the timing of expression of its gene, *Brdt* should first act in spermatogenic cells during meiotic prophase.

Brdt ensures critical functions before the first meiotic division

To understand *Brdt*'s function in spermatocytes, testes from *Brdt*^{-/-} mice were analysed morphologically for the occurrence of the first detectable defects. Figure 2A shows a total absence of post-meiotic cells in adult mice testes, since no cells expressed the acrosomal protein, Sp56, in the seminiferous tubules sections, and no round spermatids could be detected in DNA stained tubule sections. The staining of histological sections of these testes with an antibody specific for H3 phosphorylated at serine 10 (H3S10Ph), showed a dramatic decrease in cells bearing this histone mark (Figure 2B), suggesting that a blockage occurs at the end of the meiotic prophase when chromosomes should undergo compaction in preparation for the first meiotic division. A detailed analysis of spermatocytes in seminiferous tubule sections showed that earlier meiotic events occur normally, including chromosome pairing, synaptonemal complexes and sex body formation (Figure 2C). Therefore, *Brdt*'s action becomes specific and indispensable in late pachytene spermatocytes, but its absence does not significantly alter the total number of pachytene cells or cells at earlier stages. A comparable number of spermatocytes up to diplotene stage could be observed in testes from wild-type and *Brdt* KO mice (Supplementary Figure S2).

Brdt is a major determinant in the establishment of a testis-specific gene expression program

To investigate the molecular basis of *Brdt*'s action in spermatocytes, transcriptomic analyses of *Brdt*^{-/-} spermatogenic cells at 17 and 20 d.p.p. were carried out. These timings were chosen since they correspond to an accumulation of pachytene spermatocytes (17 d.p.p.) and to the pachytene/diplotene transition (20 d.p.p.), respectively, and are stages before the appearance of a visible phenotype in the *Brdt*^{-/-} animals. The results at 20 d.p.p. show that *Brdt* controls the expression levels of >3000 genes, with approximately two-thirds of the genes being downregulated and one-third upregulated in the absence of *Brdt* (corresponding to *Brdt*-activated and *Brdt*-repressed genes, respectively). At 17 d.p.p., 10% of these genes are already affected, but, in contrast to 20 d.p.p., mostly *Brdt*-activated genes are observed (Figure 3A).

We decided to exploit our transcriptomic data to uncover the characteristics of *Brdt*-regulated genes. The list of *Brdt*-regulated genes at 20 d.p.p. was subdivided into two groups: genes requiring *Brdt* for their activation (*Brdt*-activated genes) and genes repressed in the presence of *Brdt*

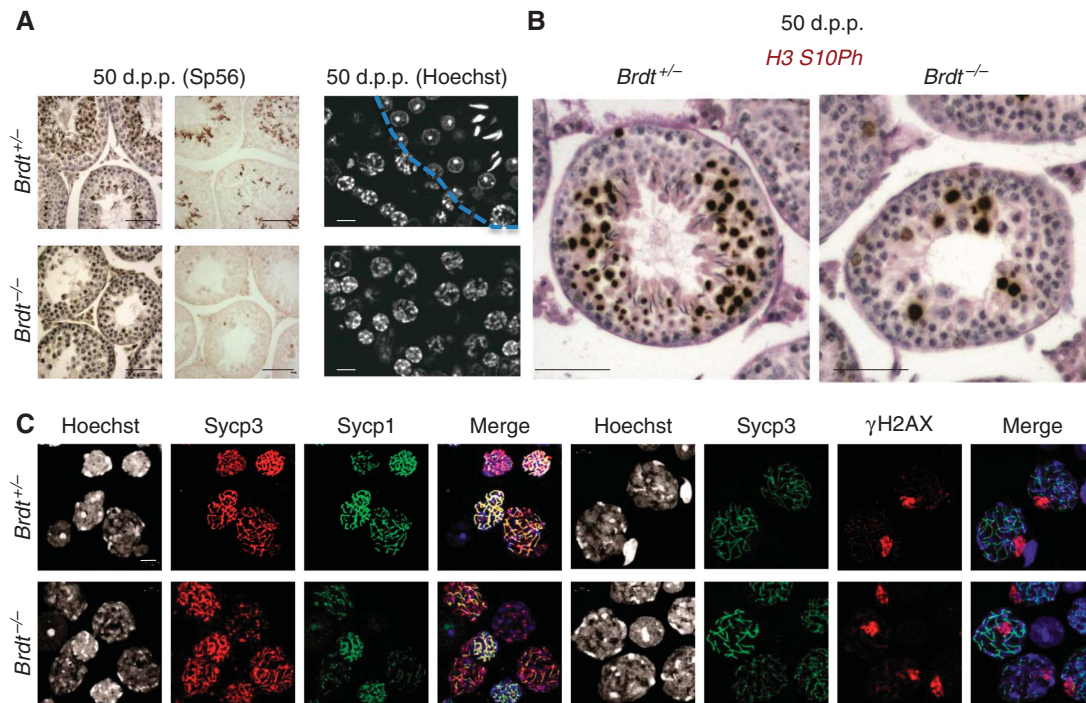


Figure 2 Brdt is required at the late stages of male meiotic prophase. (A) Testis histological sections, from 50 d.p.p. *Brdt*^{+/-} and *Brdt*^{-/-} animals, either stained by PAS/HE (Periodic Acid Schiff/Haematoxyline Eosine), or analysed by immunohistochemistry (IH) of the post-meiotic specific acrosome antigen, Sp56, without counter staining (left and middle panels, respectively). Scale bars, 50 μ m. A higher magnification of adult testis sections at 50 d.p.p., stained with Hoechst is represented (right panels). A dotted line separates meiotic cells (lower left side of the panel) from post-meiotic cells (upper right side of the panel). Scale bars, 10 μ m. (B) Testis histological sections, from 50 d.p.p. *Brdt*^{+/-} and *Brdt*^{-/-} animals stained by IH with an antibody against S10 phosphorylated histone H3. Scale bars, 50 μ m. (C) Synaptonemal complex components, Sycp1 and Sycp3, and sex body marker γ H2AX, were co-detected as indicated, in seminiferous tubule sections of *Brdt*^{+/-} and *Brdt*^{-/-} mice. Scale bars, 5 μ m.

(Brdt-repressed genes). First, we asked whether these Brdt-regulated genes are normally specifically or predominantly expressed in a particular mouse tissue. Mouse tissue transcriptomic data (available from the GEO website: GSE10744, GSE12950 and GSE9954) were downloaded and the expression pattern of our lists of Brdt-activated and Brdt-repressed genes in different tissues was established. As shown in Figure 3B (upper panels), almost all Brdt-activated genes are predominantly expressed in the testis, while the Brdt-repressed genes show no particular tissue specificity of expression. Interestingly, this profile is also visible with the Brdt-activated genes at 17 d.p.p. (Figure 3B). We then investigated whether these Brdt-regulated genes, testis-specific or not, would show any particular patterns of expression in spermatogenic cells. To this end, we used available transcriptomic data corresponding to the staged mouse spermatogenic cells: spermatogonia, spermatocytes and post-meiotic cells (GSE21749 and GSE4193). Figure 3C shows that the Brdt-activated testis-specific genes are all switched on in spermatocytes (meiotic cells), and are either fully active in these cells or have their maximum expression level in post-meiotic cells. None of these genes are expressed in spermatogonia, in agreement with the absence of Brdt expression in these cells (Figure 1). The complete opposite occurs with Brdt-repressed genes, which are nearly all predominantly expressed in spermatogonia (Figure 3C, pre-meiotic, Brdt-repressed genes). Together, these data show that Brdt is a major determinant of spermatocyte cell identity, turning on a spermatocyte-specific gene expression program and directly or indirectly repressing pre-meiotic genes.

To explore the specific contribution of BD1 in Brdt's transcriptional activity, we also performed a transcriptomic analysis of 20 d.p.p. testes from *Brdt*^{ABD1/ABD1} mice. The results show first that all of the genes affected by the absence of BD1 are included in the *Brdt*^{-/-} differentially expressed genes (Figure 3A), giving high confidence in the robustness and reliability of the transcriptomic data. These data show that BD1 is required for the transcriptional activation of more than half of the genes whose activation is also affected by the total absence of Brdt (downregulated in *Brdt*^{-/-} testis). Interestingly, within the affected genes, almost none correspond to the upregulated in the *Brdt*^{-/-} testes, demonstrating that BD1 has no role in gene repression (Figure 3A). To better characterize the BD1-dependent genes, we examined their expression patterns in various mouse tissues and in spermatogenic cells (using the same approach as described above). Figure 3B and C (lower panels) shows first that nearly all these genes are testis-specific, and second that a large majority of them are active in spermatocytes and/or in post-meiotic cells.

Brdt specifically activates promoter-acetylated testis-specific genes

In order to have a deeper insight into the molecular basis of Brdt transcriptional regulatory activities, Brdt-bound genomic regions were mapped in both meiotic and post-meiotic cells. We took advantage of our recent mapping of nucleosomes bearing acetylated histones in the same cell fractions that showed the presence of histone acetylation at the transcriptional start sites (TSSs) of a group of testis-specific genes

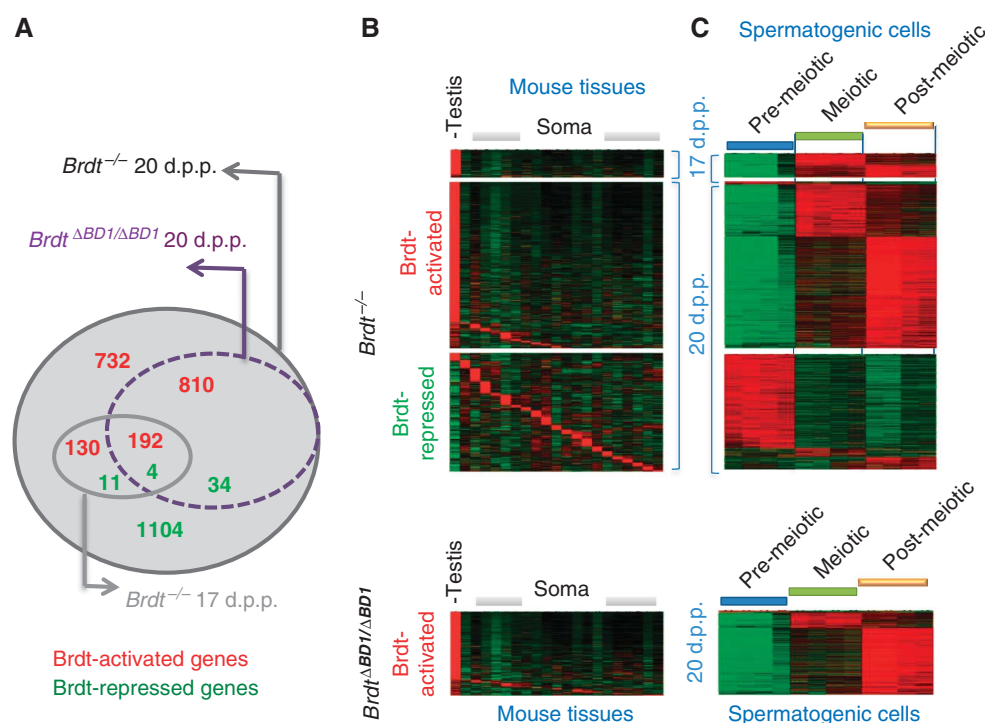


Figure 3 Brdt is a major testis-specific transcriptional regulator. (A) The transcriptome of the *Brdt*^{-/-} testes at 20 d.p.p. shows a total of 3017 genes affected by the absence of Brdt, of which 1153 genes were repressed by Brdt (upregulated in *Brdt*^{-/-} testes compared to heterozygous testes) and 1864 genes activated by Brdt (downregulated in *Brdt*^{-/-} testes compared to heterozygous testes). The genes differentially expressed in the testes of *Brdt*^{-/-} mice at 17 d.p.p. (*n* = 337) were all included in those downregulated in the *Brdt*^{-/-} testes at 20 d.p.p. The genes affected by the absence of the first bromodomain BD1 (*ΔBD1/ΔBD1*) (*n* = 1040) nearly all corresponded to a subset of downregulated genes in the *Brdt*^{-/-} testes. (B, C) RNA extracted from testes at 17 and 20 d.p.p. from *Brdt*^{+/-} (Ctrl, *n* = 6) or *Brdt*^{-/-} (*n* = 6), as well as from 20 d.p.p. testes from *Brdt*^{+/-} (*n* = 5) and *Brdt*^{ΔBD1/ΔBD1} (*n* = 5) was used for a transcriptomic analysis. The differentially expressed genes (fold change threshold of 1.5), between *Brdt*^{+/-} and *Brdt*^{-/-} mice at 17 d.p.p. and at 20 d.p.p., as well as between *Brdt*^{ΔBD1/ΔBD1} and wild-type tests at 20 d.p.p., were respectively classified as 'Brdt-activated genes' (genes repressed in the absence of Brdt or in the presence of *ΔBD1* Brdt), or as 'Brdt-repressed genes' (genes activated in the absence of Brdt). Their respective expression status was then retrieved from mouse tissue transcriptomes (B) and staged spermatogenic cell transcriptomes (C) and shown as heatmaps. The low versus high expression levels are represented on a green to red scale. 'Soma' represents the following mouse tissues from left to right: ovary, embryonic stem cells, placenta, foetus, brain, eye, pituitary, adipose tissue, adrenal gland, bone marrow, heart, kidney, liver, lung, muscle, salivary gland, seminal gland, small intestine, spleen and thymus.

(Tan *et al*, 2011). Here, we used the SeqMiner software capable of ChIP-Seq peak visualization in defined genomic regions (Ye *et al*, 2010) to look at Brdt binding in the TSS region of these genes (10 kb, centred on the TSS), with respect to histone acetylation. Interestingly, this approach identified a group of >3700 genes showing a precise colocalization of Brdt on the TSSs marked by histone acetylation (Figure 4A). These genes could be divided into two broad categories with respect to Brdt binding in meiotic cells and in round spermatids (post-meiotic). In the first category, an increased Brdt binding was observed after the completion of meiosis while in the second group, in contrast to the first group, a decrease or loss of Brdt was observed in the post-meiotic cells. After analysing the expression profile of the genes from these two categories, using the approach presented above (i.e., by using these gene lists to interrogate available transcriptomic data corresponding to the staged mouse spermatogenic cells, spermatogonia, spermatocytes and post-meiotic cells, from GSE21749 and GSE4193), we discovered that the first group is remarkably enriched in genes, which are highly expressed in round spermatids (Figure 4A, histogram, upper panel), while the expression of most genes of the second category culminates in meiotic cells (Figure 4A, histogram, lower panel). It is of note that, due to the inheritance of stable RNAs

expressed in spermatocytes by the haploid cells, the post-meiotic genes listed in this category are not necessarily active.

We then confronted the list of genes affected by the absence of Brdt in our transcriptomic data (Figure 3) to the list of genes bearing Brdt at their TSS found here. This analysis showed that about half of the genes requiring Brdt for their activation in 20 d.p.p. spermatogenic cells are bound by Brdt at their TSS (Figure 4B, Brdt activated), suggesting a direct role of Brdt in their activation. However, only a small fraction (about 15%) of genes repressed by Brdt in the same spermatogenic cells (Figure 4B, Brdt repressed) are bound by Brdt at their TSS, indicating that the observed Brdt-mediated repression of pre-meiotic genes is rather an indirect phenomenon.

Overall, these analyses showed that the presence of Brdt on TSS-bearing acetylated histones is an important determinant in Brdt-dependent meiotic gene activation in spermatogenic cells, whereas Brdt-repressive action on pre-meiotic genes should be mostly indirect, probably due to the activation of critical repressors. We also interrogated our ChIP-Seq data on the general distribution of Brdt over the genome in spermatocytes and round spermatids. This analysis shows that only a fraction of Brdt-bound regions are in fact gene TSS and that

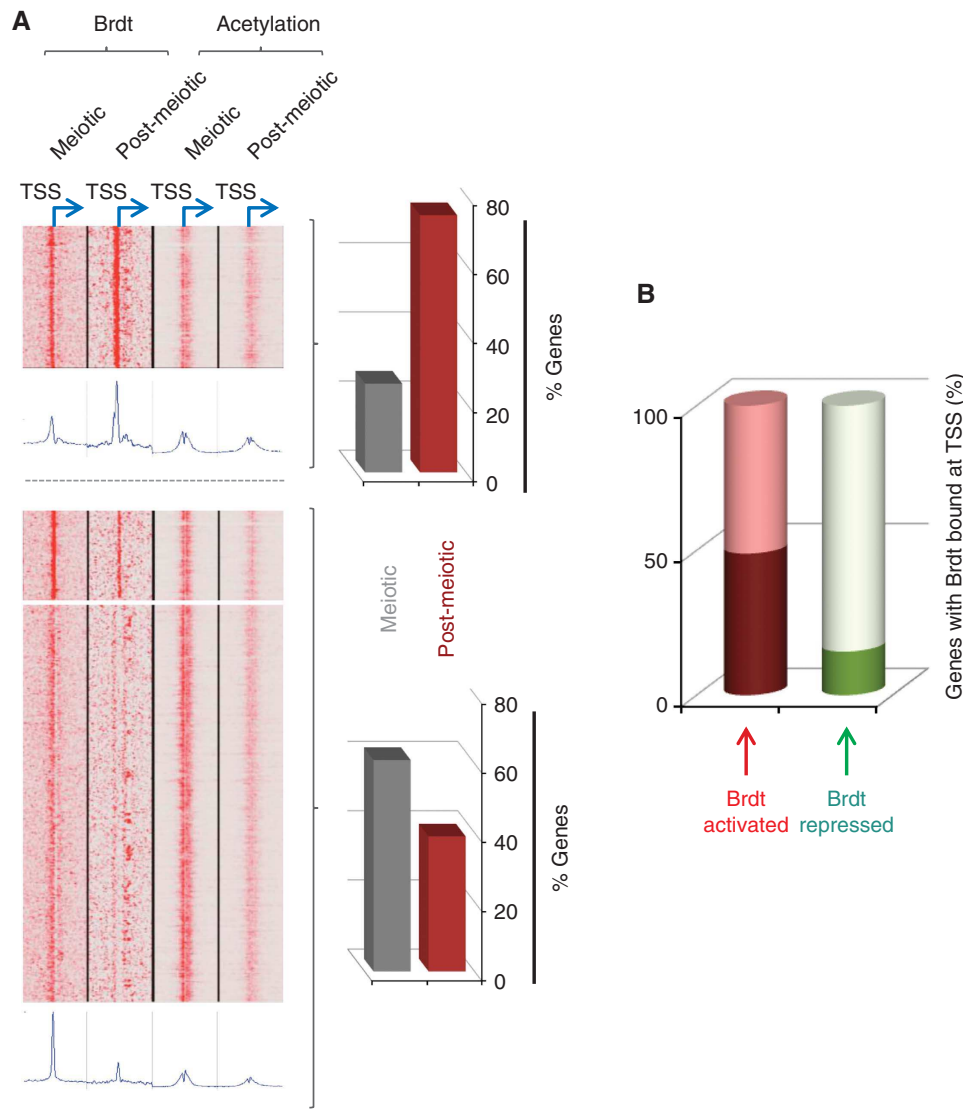


Figure 4 Brdt binding and histone acetylation directed stage-specific gene expression. **(A)** Chromatin-bound Brdt was immunoprecipitated from fractionated spermatocyte populations and round spermatids and the associated DNA sequenced and position and the intensity of Brdt peaks determined. The SeqMiner software (Ye *et al*, 2010) was used to illustrate Brdt (this work) and histone acetylation peaks, which we recently reported from the same cell populations (Tan *et al*, 2011), at ± 5 kb around gene TSSs. Left panels: heatmaps and quantification profiles of Brdt or histone acetylation peaks in TSS regions in meiotic and post-meiotic male germ cells corresponding to two categories of Brdt-bound TSSs: the upper panels show TSS associated with an increase of Brdt binding in post-meiotic cells as compared to meiotic cells, whereas the lower panels show TSS with a decrease or no Brdt binding in post-meiotic cells; The histograms (right) indicate the proportion of genes with meiotic and post-meiotic profile of expression in each of these two gene categories. The gene expression profiles were established following the strategy described for Figure 3C (but only genes with fold changes > 1.2 between the meiotic and post-meiotic cells expression levels were taken into account). **(B)** Respective proportions of Brdt-activated and Brdt-repressed genes (see Figure 3) whose TSS is associated with a Brdt peak and enriched in acetylated histones: nearly half of the Brdt-activated genes show colocalized Brdt and histone acetylation peaks in TSS, whereas this is the case of only a minority of Brdt-repressed genes.

the majority of the peaks are intergenic (66 and 60%, respectively, in spermatocytes and round spermatids), suggesting that Brdt may also have a global genome organizing role (Supplementary Figure S3).

Brdt is essential to the completion of meiosis I

The observation of a transcriptional regulatory role of Brdt suggested that it could be a tissue-specific paralogue of Brd4, with a 'Brd4-like' function. Indeed, a previous report demonstrated a striking sequence similarity between the C-terminal region of Brd4 with Brdt among all BET members (Bisgrove *et al*, 2007). This report also showed that this domain in

Brd4 and in ectopically expressed Brdt is required for the recruitment of positive transcription elongation factor b (P-TEFb), suggesting that Brdt's transcriptional function could involve the same mechanism as Brd4. One prediction of this hypothesis is that in spermatogenic cells, at least a fraction of Brdt should be found in a complex with P-TEFb components, cyclin T1 and Cdk9. Extracts from adult mouse testes were therefore subjected to immunoprecipitation by anti-Cdk9 and anti-cyclin T1 antibodies to test their interaction with Brdt (Figure 5A). The same experiment was carried out in parallel with extracts from *Brdt*^{-/-} testes, which gave an indication of the specificity of the experiment

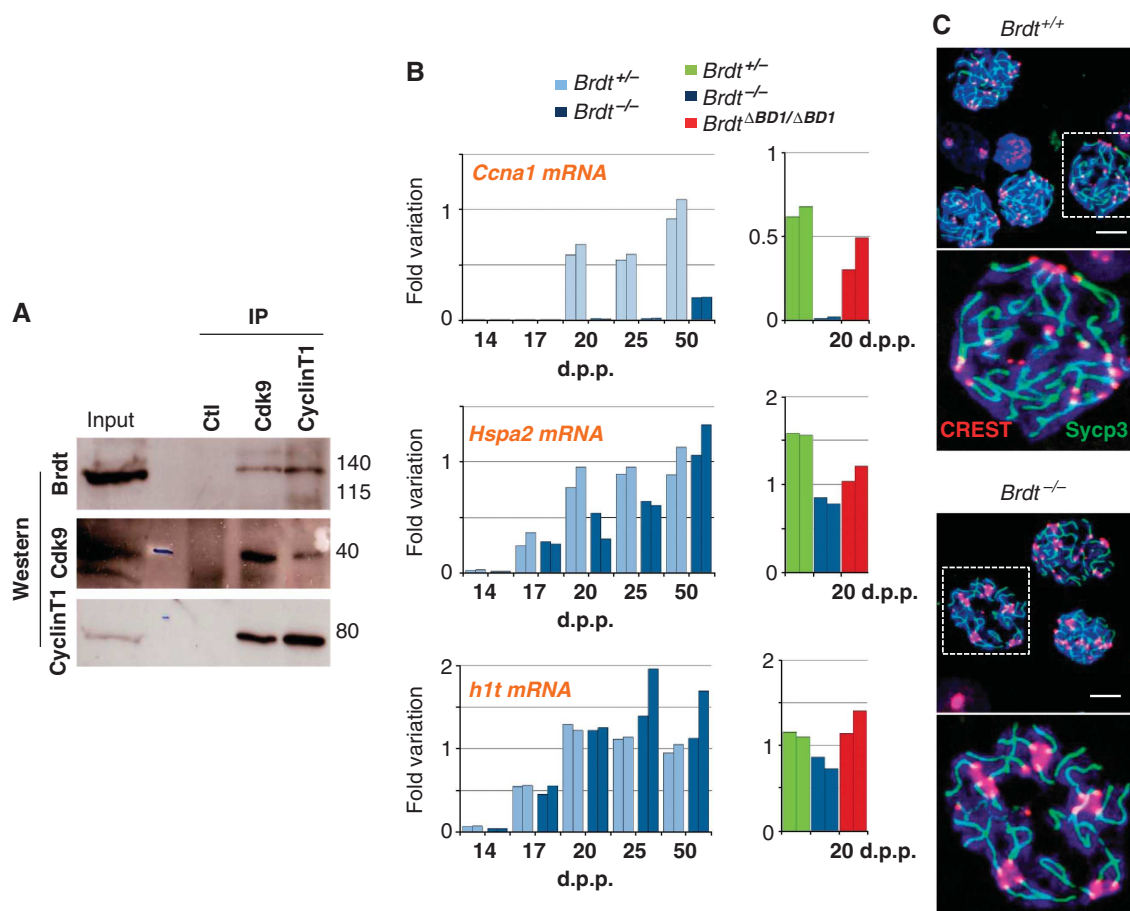


Figure 5 *Brdt* is a testis-specific 'Brd4-like' factor and a major driver of meiosis I. (A) Extracts from *Brdt*^{+/+} testes were used for an immunoprecipitation using an anti-Cdk9, an anti-cyclin T1 antibody or an irrelevant antibody (pre-immune rabbit serum). Immunoprecipitated proteins were detected with the indicated antibodies. (B) RNA was extracted from testes at the indicated postnatal ages and the expression of three meiotic genes *Ccna1*, *H1t* and *Hspa2* (Dix *et al*, 1996) was monitored by RT-qPCR. The right panels show the expression of the same genes in testis from the three indicated genotypes, at 20 d.p.p. The histograms represent the values of biological duplicates, normalized with respect to *Actin* as a control gene, and to *Brdt* mean expression in 50-day-old wt testes. (C) The synaptonemal complex component, Sycp3 (green), and centromeric proteins CREST (red), were co-detected as indicated, in seminiferous tubule sections of *Brdt*^{+/+} and *Brdt*^{-/-} mice. The panels show higher magnifications of two representative spermatocytes either wild type or *Brdt*^{-/-}. A general view of the spermatocytes is also shown. Scale bars, 5 μm. Figure source data can be found with the Supplementary data.

(Supplementary Figure S4). These figures show that significant amounts of Brdt could be co-immunoprecipitated with both Cdk9 and cyclin T1, only from wild-type testes and that no cyclin T1, Cdk9 or Brdt could be detected when an irrelevant antibody was used in the immunoprecipitation of a wild-type testis extract (Figure 5A). These data confirmed that Brdt is a true functional tissue-specific paralogue of Brd4.

We then addressed the question of whether some of the Brdt-regulated genes could give a molecular explanation for the meiotic arrest occurring in the absence of Brdt. Within the list of genes repressed by the absence of Brdt, we noticed a critical meiotic gene, *Ccna1*, which was strongly downregulated (14-fold compared to control according to our 20 d.p.p. transcriptomic analysis). *Ccna1* is a testis-specific A-type cyclin gene, known to be expressed in spermatocytes and to be absolutely essential for spermatocytes to enter into the first meiotic division (Liu *et al*, 1998; Nickerson *et al*, 2007). We confirmed the specific downregulation of *Ccna1* gene in the absence of Brdt by RT-qPCR approach (Figure 5B). Pachytene spermatocytes appear at 14 d.p.p. and accumulate up to 20 d.p.p. when diplotene spermatocytes become visible.

Using testes from aged-matched wild-type and *Brdt*^{-/-} mice at different times of pachytene spermatocytes differentiation, we monitored the expression of *Ccna1*, as well as of two other genes, *Hspa2* and *H1t*, known to be activated in pachytene cells but whose expression was not significantly affected by the absence of Brdt (according to our transcriptomic analysis). Figure 5B shows that in wild-type testes, the appearance of pachytene spermatocytes is associated with the activation of the three genes, but that *Ccna1* is expressed after the other two, at late pachytene/diplotene stage (appearing in 20 d.p.p. testes). These experiments confirm first that, in the absence of Brdt, pachytene spermatocytes are present and second that Brdt specifically controls the expression of *Ccna1* as opposed to other pachytene-specific meiotic genes.

Finally, the published phenotype of *Ccna1* KO mice (Liu *et al*, 1998) is very similar to that exhibited here in the total absence of *Brdt*, in particular the absence of post-meiotic cells with a significant decrease of H3S10Ph-positive meiotic cells (Figure 2B) and an abnormal centromere clustering (Nickerson *et al*, 2007; Figure 5C; Supplementary Figure S5), suggesting that the absence of *Ccna1* expression

in *Brdt*^{-/-} spermatocytes could by itself explain the phenotype observed in *Brdt* KO animals. We also checked our ChIP-Seq data to know whether Brdt could directly regulate *Ccna1* expression and binding to its TSS. Our data showed no significant Brdt binding to this gene promoter suggesting that either Brdt-dependent activation of *Ccna1* is indirect or that for some reasons Brdt bound to this gene was not accessible to our antibody.

Brdt's function is critical for spermatocyte survival

The hypothesis of a critical role of the C-terminal domain of Brdt as being responsible for P-TEFb recruitment during male germ cell differentiation received unexpected support from another mouse model: chimeric mice with male germ cells expressing a C-terminal tagged *Brdt*.

In order to tag the endogenous Brdt, three epitopes (tap tag) were introduced at the 3' end of *Brdt*'s last exon in mouse embryonic stem (ES) cells (Supplementary Figure S6A). Two clones (AT1 agouti, *Brdt*^{+/tag}) were injected into blastocysts from C57BL/6 (black *Brdt*^{+/+}) mice. Unexpectedly, in chimeric mice, whenever heterozygous *Brdt*^{+/tag} ES cells significantly contributed to testis formation, testes were of smaller volume and reduced weight as compared to wild-type testes (Figure 6A), and seminiferous tubules were devoid of meiotic and post-meiotic cells (Figure 6B). The same knock-in, in an independent ES cell line, 46C, resulted in chimeric mice displaying exactly the same phenotype (unpublished work). In addition, AT1 ES cells were used to tap tag another testis-specific gene, *th2b* encoding the testis-specific histone H2B variant, TH2B, known to be expressed in

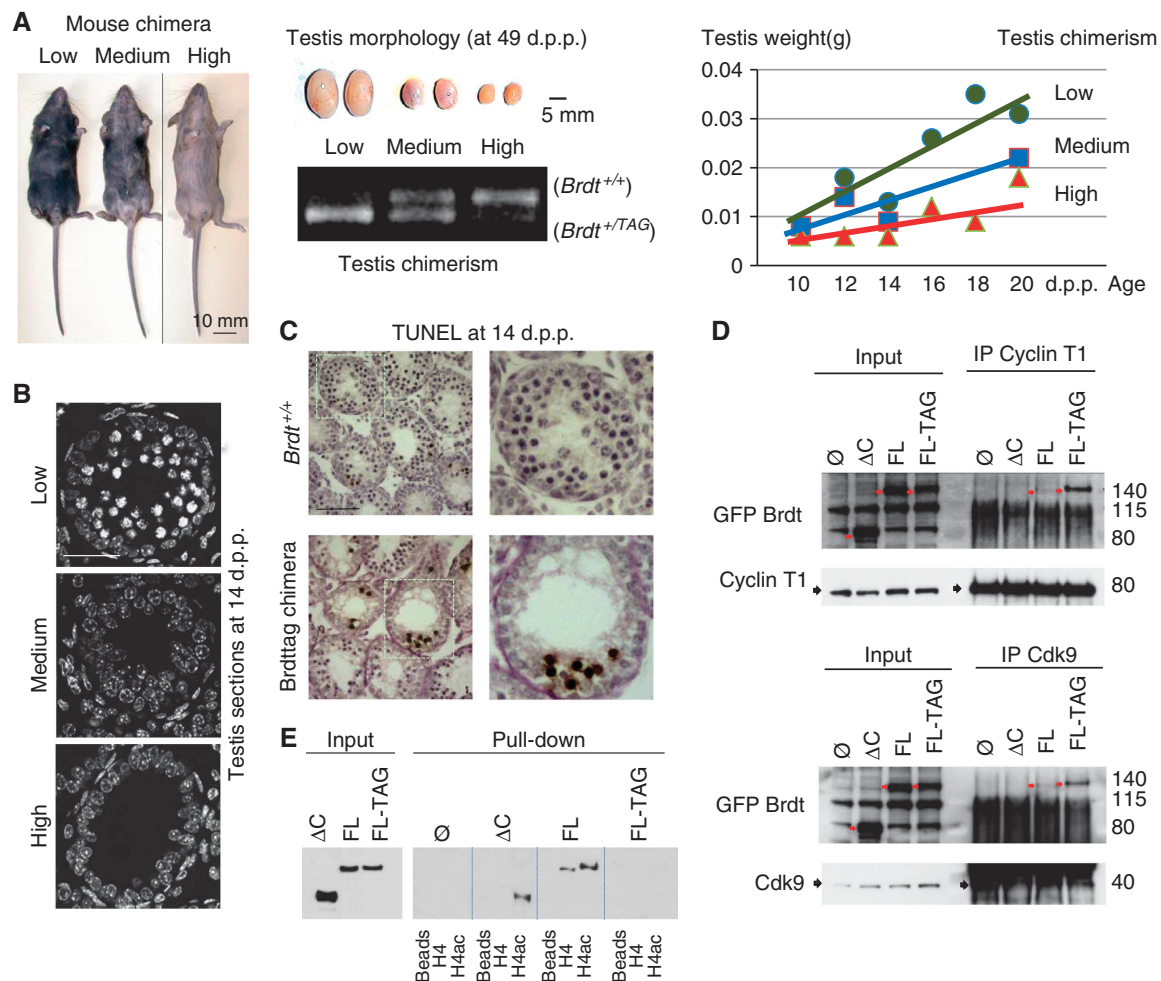


Figure 6 C-terminal-tagged Brdt severely interferes with spermatogenic cell differentiation. **(A)** The degree of the contribution of AT1 *Brdt*^{+/tag} ES cells (129) to embryogenesis was evaluated by coat colour (left panel) and more specifically to testis formation by genome type-specific PCR on testis DNA thanks to the strain-specific polymorphism of the *D2Mit94* locus (middle lower panel). Chimeric mice testes were grouped into three classes according to the PCR-based estimation of their level of chimerism and their respective weights were plotted as a function of postnatal age (right panel). Representative testes from 49-day-old mice belonging to the three indicated classes are shown on the middle upper panel. **(B)** Testes from the three classes of 14-day-old chimeric mice were fixed and stained by Hoechst (scale bars, 50 μ m). **(C)** TUNEL assay was carried out on age-matched wild-type or chimeric mouse testes harvested at 14 d.p.p. Scale bars, 50 μ m. **(D)** HeLa cells were transfected with the indicated GFP-Brdt constructs. Δ C corresponds to GFP-Brdt deleted of its C-terminal region (Pivot-Pajot *et al*, 2003). FL and FL TAG correspond to the full-length GFP-Brdt without or with the C-terminal tag, respectively (using the same tag as in the knock-in approach). After immunoprecipitation using an anti-cyclin T1 (upper panels) or an anti-Cdk9 antibody (lower panels), the presence of co-immunoprecipitated GFP-Brdt was monitored using an anti-GFP antibody. The positions of the GFP-Brdt fusion proteins in the input and immunoprecipitated materials are indicated by red arrows. **(E)** Cos7 cells were transfected with the same constructs as above but the extracts were used to test Brdt H4 histone tail binding. Extracts from cells expressing the indicated constructs were divided into three and incubated with streptavidin beads or streptavidin beads coupled with biotinylated H4 or tetra-acetylated H4 peptides (indicated). Bound proteins were then revealed by an anti-GFP antibody. \emptyset represents extracts used in the pull down from non-transfected cells. Figure source data can be found with the Supplementary data.

spermatocytes (Supplementary Figure S6B), and, not only was germline transmission successful and a mouse strain established, but also the tagged protein was expressed, with no apparent toxicity in spermatocytes (Supplementary Figure S7), demonstrating the specific effect of the C-terminal tagged Brdt in these cells and not of the tag itself.

These experiments indicate that the tag alters critical functions of Brdt, as soon as the protein is expressed in early spermatocytes. In line with this conclusion, in testes from 14-day-old chimeric mice, only a few days after the activation of the *Brdt* gene, spermatocytes massively disappear and most of the remaining cells are apoptotic (Figure 6C).

Due to its C-terminal position, we hypothesized that the tag may interfere with the capacity of Brdt's 'Brd4-like' C-terminal domain to recruit P-TEFb complex to the acetylated chromatin (Bisgrove *et al*, 2007). Accordingly, using the ectopic expression of different Brdt constructs, we explored P-TEFb recruitment by the C-terminal domain of Brdt. Unexpectedly, we found that the presence of the tag in its vicinity leads to a remarkable enhancement of P-TEFb recruitment (Figure 6D, FL TAG). We also observed in a peptide pull-down experiment that the C-terminal tag strongly interferes with the capacity of Brdt's bromodomains to bind an acetylated histone H4 peptide (Figure 6E, FL TAG). This result is actually in good agreement with the recent model for Brd4-P-TEFb complex proposing a conformational change bringing the CTD at the vicinity of the Brd4 bromodomains (Schroder *et al*, 2012). These results suggest that the

enhancement of Brdt-P-TEFb complex formation in the presence of the C-terminal tag could reflect the inability of the protein to bind chromatin, which would remain bound to P-TEFb in the nucleosolic fraction. It is important to note that these experiments could not be performed in spermatogenic cells from chimeric mice because of the rapid disappearance of cells from the testis of these animals (Figure 6C).

Brdt's BD1 is essential to link histone removal to TPs assembly

To test our original hypothesis of a potential role of Brdt in the replacement of hyperacetylated histones in elongating spermatids, we focused our attention on post-meiotic cells, where the global and genome-wide histone hyperacetylation occurs. We first questioned whether the wave of histone hyperacetylation itself normally occurs in the absence of a functional Brdt BD1. Supplementary Figure S8 shows that elongating spermatids from *Brdt*^{ΔBD1/ΔBD1} testes contain hyperacetylated histones, as normal elongating spermatids. Because of the capacity of Brdt's BD1 to specifically act on hyperacetylated histones, we questioned whether the replacement of histones is maintained in the absence of BD1. The analysis of elongating spermatids from *Brdt*^{ΔBD1/ΔBD1} mice showed that, although TPs and protamines (Prms) are synthesized, they remain in the cytoplasm (Figure 7A) and histone replacement does not occur, as judged by the co-detection of TH2B and protamine 1 (Figure 7B). This situation is never observed in wild-type spermatids, where Prm1 accumulates in the nucleus after the disappearance of

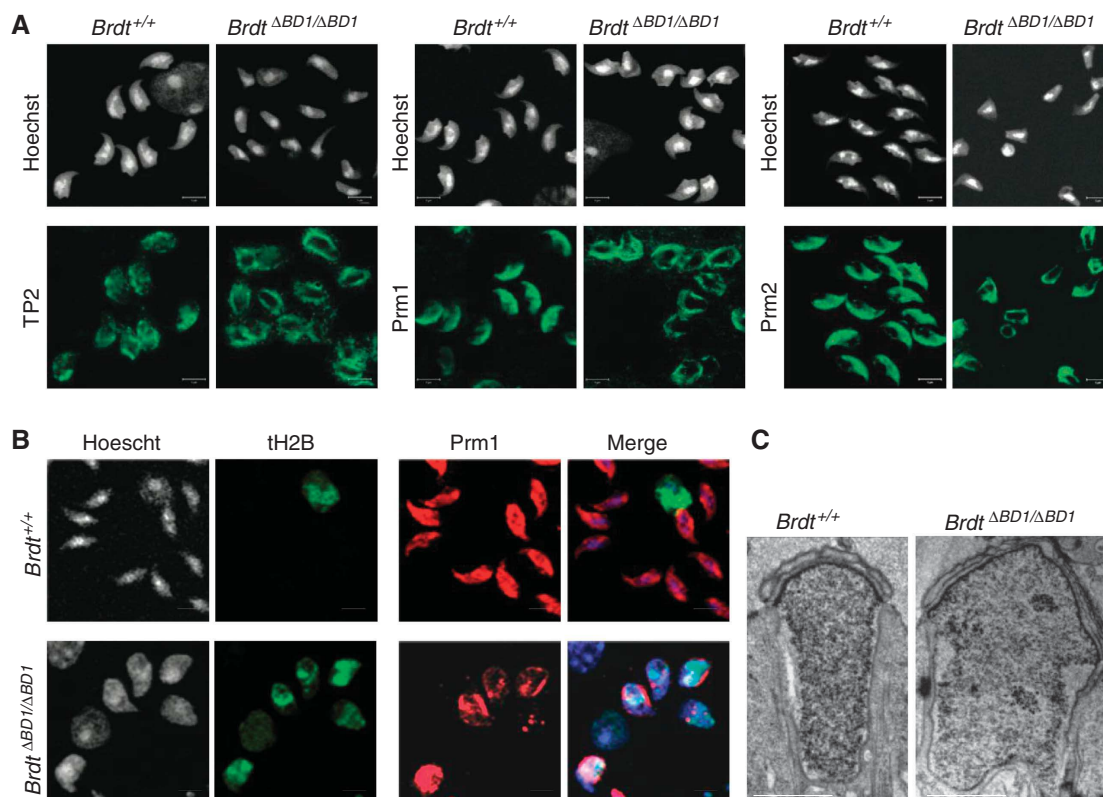


Figure 7 Post-meiotic functions of Brdt's first bromodomain. (A) An immunofluorescence detection of TP2 and of Prm1 and Prm2 (B) as well as a co-detection of the histone TH2B (green) and of Prm1 (red) were performed; Scale bars, 5 μm. (C) A comparative observation by electronic microscopy (EM) of two representative elongating spermatids at the same stage (as evaluated by the percentage of coverage of the spermatids' heads by the acrosome) from wild-type (+ / +) and *Brdt*^{ΔBD1/ΔBD1} mice is shown. Scale bars, 1 μm.

histones (Figure 7B). The absence of genome compaction in elongating cells expressing a BD1-less Brdt is also clearly visible by electron microscopy, comparing elongating spermatids at the same stage of acrosome development (Figure 7C).

These data suggest that BD1 is required for the post-meiotic re-organization of the male genome and directly and/or indirectly mediates the replacement of acetylated histones. Additionally, we observed that, when TP and Prms accumulate in the cytoplasm of elongating spermatids of *Brdt*^{ΔBD1/ΔBD1} mice, BD1-less Brdt is also in the cytoplasm while at earlier stages, in the absence of TP synthesis, the protein is found in the nucleus of spermatids (Supplementary Figure S9A). In fact, the ability of Brdt to interact with acetylated chromatin, essentially through its first bromodomain, and to 'squeeze' acetylated nucleosomes could be important for the protein to mediate the histone-TP exchange (Supplementary Figure S9B). Indeed, we previously observed that Brdt is capable of inducing a dramatic compaction of chromatin in an acetylation-dependent manner (Pivot-Pajot *et al*, 2003). This activity of Brdt is enhanced when Brdt lacks its C-terminal part, which is close to a splice variant of Brdt, also produced in spermatogenic cells (Pivot-Pajot *et al*, 2003). Therefore, in elongating spermatids, histone hyperacetylation in the presence of Brdt could lead to a similar phenomenon, which would be coupled to histone eviction and TP assembly. Interestingly, the capacity of Brdt in inducing an acetylation-dependent chromatin compaction has recently been shown in the rat germ cells (Dhar *et al*, 2012). Here, our experimental data suggest that this action requires a bromodomain-dependent protein 'polymerization', as shown by the occurrence of FRET between a N-terminal GFP of a Brdt molecule and a C-terminal RFP of another Brdt molecule (Supplementary Figures S9C). Based on this observation, we propose a working model, according to which, in elongating spermatids, Brdt uses the histone hyperacetylation signal to bind chromatin and induce a 'chromatin squeezing' process through a Brdt–Brdt interaction facilitating histone eviction and their replacement by TPs.

Discussion

The functional dissection of Brdt's activity reported here opens the door to important conceptual developments and brings to light crucial and so far unknown aspects of mammalian spermatogenesis. First, *Brdt* is activated at the onset of meiosis and becomes critical for the activation of hundreds of testis-specific genes, which are fully active either in spermatocytes or in post-meiotic spermatids. Brdt acts therefore as a transcriptional activator whose action becomes visible at the time when pachytene spermatocytes appear and culminates at the late pachytene/diplotene transition. We also found that Brdt's binding to the TSS of a gene is a strong predictor of its stage-specific pattern of expression. Indeed, although during meiosis both histone acetylation and Brdt are observed at the TSS of many testis-specific genes, a change in the level of Brdt binding between meiotic and post-meiotic cells is an indicator of their meiotic or post-meiotic nature. An enhancement of Brdt recruitment after the completion of meiosis clearly distinguishes a set of genes, which are predominantly expressed in round spermatids. Interestingly, this marking of the TSS of post-meiotic genes

in spermatocytes by both histone acetylation and Brdt is probably facilitating gene activation in round spermatids, similar to the action of Brd4 on bookmarked genes described in somatic cells (Zhao *et al*, 2011).

In contrast, a loss of Brdt's binding at a gene's TSS after meiosis is associated with a decrease of its expression in haploid cells. Remarkably, nearly half of the genes whose meiotic activation is dependent on Brdt (with a decreased expression in *Brdt*^{−/−} spermatocytes) are genes whose TSS is enriched in acetylated histones and bound by Brdt, indicating a direct role for Brdt in their activation. In contrast, only a small fraction of Brdt-repressed genes contained histone acetylation and Brdt at their TSS, suggesting that the repression of pre-meiotic genes in spermatocytes is predominantly indirectly controlled by Brdt.

It is also of note that many genes with Brdt-bound TSS (represented in Figure 4A) are not affected by the absence of Brdt (their expression was not changed in *Brdt*^{−/−} spermatocytes). It is likely that, in the absence of Brdt, some of these genes could be rescued by other members of the BET family, Brd2, Brd3 and Brd4, all expressed in male germ cells (Shang *et al*, 2004).

The partial functional redundancy of Brdt and other BET members is also suggested by the phenotype of tap-tagged Brdt-expressing cells, which die soon after the activation of *Brdt* expression in early spermatocytes, while these early meiotic cells appear healthy in the total absence of Brdt in *Brdt*^{−/−} mice. Indeed, in the absence of Brdt other BET proteins may ensure some Brdt-like functions, but the non-functional tagged Brdt could block this compensation by other BET members and hence become rapidly deleterious.

The confrontation of our transcriptomic and ChIP-Seq data also revealed important indirect transcriptional roles of Brdt, both as repressors and as activators. These functions could be relayed by a direct Brdt-dependent activation of transcriptional repressors and activators in spermatocytes.

This work also highlights a 'Brd4-like' nature of Brdt, by demonstrating the presence of Brdt in the P-TEFb complex in spermatogenic cells. This observation is perfectly in line with the presence in Brdt of a C-terminal domain similar to that of Brd4, shown to be involved in the recruitment of P-TEFb (Bisgrove *et al*, 2007; Schroder *et al*, 2012). It is also in agreement with the deleterious effect of a tag placed adjacent to this domain, as shown here. We unexpectedly found that the C-terminal tag not only strongly enhanced the Brdt–P-TEFb interaction but also prevented its binding to an acetylated histone H4 peptide. A recent work from Melanie Ott's laboratory proposes a simultaneous binding of Brd4 BD2 and of its C-terminal Brdt-like domain with acetylated cyclin T1 leading to a structural change bringing the C-terminal to the vicinity of the bromodomains (Schroder *et al*, 2012). In the case of Brdt, the presence of the tag next to the C-terminal domain may interfere with the required structural change and accessibility of the bromodomains for chromatin/histone binding. The tagged Brdt–p-TEFb complex could therefore accumulate in cells due to the inability of Brdt to transfer the kinase complex onto the paused polII bound promoters.

All the findings reported here also point to Brdt as a particularly attractive target in pharmacological approaches to male fertility. Indeed, the recent discovery of bromodomain inhibitors makes it possible to design Brdt-specific

bromodomains inhibitors to disrupt spermatogenesis. Accordingly, a small molecule inhibitor targeting the bromodomains of the BET members, JQ1, has very recently been shown to severely interfere with spermatocytes and round spermatids development in a reversible manner (Matzuk *et al*, 2012).

Finally, from our previous structural studies demonstrating that Brdt's BD1 is the first bromodomain known to specifically recognize hyperacetylated histone H4 (Moriniere *et al*, 2009), we anticipated that BD1 should mainly act in elongating spermatids, during the genome-wide hyperacetylation of histones, which occurs before their replacement. In the absence of a functional BD1, the predicted defects in the removal of hyperacetylated histone were confirmed here. Indeed, in *Brdt*^{ABD1/ABD1} mice, while histone replacing proteins, TP_s and Prm_s, were synthesized and histone hyperacetylation occurred normally, histone removal and the assembly of TP_s and Prm_s did not happen. TP_s and Prm_s accumulated in the cytoplasmic and perinuclear regions of these elongating spermatids, where the BD1-less Brdt was also observed. This latter observation suggests that Brdt may provide a link between hyperacetylated nucleosomes and TP_s and mediate their exchange. Accordingly, in the absence of BD1, the mutated protein unable to bind acetylated chromatin, although nuclear in round spermatids, becomes trapped in the cytoplasmic and perinuclear regions, as soon as TP_s are synthesized in elongating spermatids.

We previously showed that Brdt, in the presence of hyperacetylated nucleosomes, could 'squeeze' the chromatin fibre (Pivot-Pajot *et al*, 2003), and this observation has recently been confirmed even in the rat haploid male germ cells (Dhar *et al*, 2012). Our data also suggest that Brdt polymerizes on chromatin fibres, explaining its 'squeezing' effects. The presence of TP_s and appropriate chaperones around Brdt could mediate the final eviction of histones and their replacement. It is however important to note that we cannot exclude an indirect effect of Brdt in histone replacement. Indeed, as shown here, a significant number of post-meiotic genes require Brdt BD1 to be fully active, and among these, there are specific factors, including those involved in splicing, which may affect the function of other genes, as recently shown (Berkovits *et al*, 2012).

In summary, we present here a comprehensive functional study of a member of the BET family, demonstrating for the first time in a physiological setting that the bromodomains have specific roles and act in a stage-dependent manner.

Materials and methods

Mouse models

Brdt^{ABD1/ABD1} mice were previously described (Shang *et al*, 2007). *Brdt* KO mice were obtained from the International KnockOut Mouse Consortium, Welcome Trust Sanger Institute, UK, and their genotype confirmed. The 'KnockOut-first' allele (tm1a) contains an IRES:*lacZ* trapping cassette and floxed promoter-driven *neo* cassette inserted into the 4th intron of the *Brdt* gene, disrupting *Brdt* function. The construction of the targeting vector, electroporation of C57BL/6N ES cells and generation of mice bearing a null mutation of *Brdt* was described in Skarnes *et al* (2011). *Brdt* and *th2b* tag tagging was accomplished by adapting the gap-repair recombineering technique from Liu *et al* (2003) to construct our *Brdt* and *th2b* tag-tag targeting vectors for homologous recombination in ES cells (AT1 and 46C lines). Animal experiments were approved by *ad hoc* committees and all the investigators directly involved, have an official animal-handling authorization obtained after a 2-week intensive training

and a final exam. Knock-in through homologous recombination in ES cells is described in detail in Supplementary Materials and methods.

Analyses of testis sections and spermatogenic cells

Spermatogenic cells were analysed either on sections of paraffin-embedded AFA-fixed testes or seminiferous tubules or testis 'imprints' on slides, as previously described (Hazzouri *et al*, 2000; Govin *et al*, 2007, 2010).

Spermatogenic cell preparations for in situ analysis

Staged seminiferous tubules: Mice were sacrificed by cervical dislocation. Testis and epididymis were biopsied, washed in PBS. Albuginea was removed and seminiferous tubules were dissected at 4°C in DMEM with 100 mM sucrose. Microdissection and isolation of staged tubules was carried out under a transillumination microscope, as previously reported (Kotaja *et al*, 2004). Tubules were cut into 2-mm segments and each segment was 'squashed' by pressure between a coverslip and the slide, prefixed 20 s in liquid nitrogen, 10 min in 90% ethanol, air dried, and processed for immunofluorescence or β -galactosidase activity staining.

Testis 'imprints' were prepared as follows. Testes were frozen in liquid nitrogen, cut in two parts and directly applied on slides by apposition. Each slide was fixed in 90% ethanol, air dried, and processed for immunofluorescence staining. X gal staining for Brdt expression is detailed in Supplementary Materials and methods.

Immunofluorescence, immunohistochemistry and microscopy

Protein visualization by immunofluorescence was carried out as previously described (Govin *et al*, 2007). Protein detection by immunohistochemistry was performed exactly as described in Hazzouri *et al* (2000). The antibodies used were as follows: goat polyclonal anti-TP2 antibody 1/250 (Santa Cruz biotechnology), rabbit polyclonal anti-TP1 antibody 1/500 (gift from Dr Kistler, University of South Carolina), rabbit polyclonal anti-H4ac4 antibody 1/500 (Millipore), mouse monoclonal anti-Prm1 and Prm2 antibodies 1/250 (Shaltech), rabbit polyclonal anti-acrosomal protein (Sp56) antibody 1/200, rabbit polyclonal anti-H3S10Ph antibody 1/500 (Millipore), mouse monoclonal anti-Sycp3 antibody 1/500 (Abcam), rabbit polyclonal anti-Sycp1 antibody 1/500 (Abcam), rabbit monoclonal anti-phosphoH2Ax 1/500 (Epitomics). Anti-Brdt antibodies were generated either as described in Govin *et al* (2006) or in Shang *et al* (2007). The secondary antibodies were Alexa 488 or Alexa 546 fluor conjugates (Molecular Probes, Invitrogen). Apoptotic cells were detected by TUNEL assay, using a Millipore kit following the furnished instructions.

Electron Microscopy morphological analysis is described in Supplementary Materials and methods.

FRET experiments

FRET experiments are described in Supplementary Materials and methods.

PCR-based analyses

The degree of AT1 ES cell (129 strain) contribution to C57BL/6 mice germline was evaluated by PCR on testis DNA as described in Cho *et al* (2001). Gene expression analysis was carried out on purified RNA using appropriate sets of primers, listed in Supplementary Materials and methods. Chimeric mice testis DNA genotyping is also detailed in Supplementary Materials and methods.

Transcriptomic analyses

The transcriptomes of age-matched testes from control (wild type) and mutant mice as well as fractionated spermatogenic cells were obtained using the Illumina mouse WG-6 V2.0 gene expression array. For testes, three independent experiments were performed using two mouse models: *Brdt* KO at 17 d.p.p. or at 20 d.p.p., or *Brdt*^{ABD1/ABD1} mice at 20 d.p.p. and age-matched wild-type testes (5 or 6 replicates of the mutated and of the corresponding controls for each model). Testis and fractionated cells RNA was harvested with TRI Reagent (Sigma), and RNA was isolated following manufacturer's instructions.

The detailed experimental procedure is described in Supplementary Materials and methods.

Analyses of expression patterns using online expression data

The patterns of expression of the genes, found differentially expressed in *Brdt* KO and *Brdt*^{ABD1/ABD1} mice, were analysed in normal mouse tissues and during spermatogenesis using transcriptomic data available online as described in Tan *et al* (2011). The raw expression data (.CEL files) of four studies (available from the GEO website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; GSE10744, GSE12950, GSE9954, GSE21749 and GSE4193) were downloaded from the GEO website and RMA normalized using the GeneSpring GX software (Agilent Technologies). The analysis was carried out as described in Tan *et al* (2011). The expression patterns are represented as heatmaps using the Permutmatrix software (<http://www.lirmm.fr/~caraux/PermutMatrix/index.html>).

Immunoprecipitation, pull-down and ChIP analyses

An anti-*Brdt* ChIP was performed on micrococcal digested chromatin as described by Tan *et al* (2011). Details of sequencing and data analyses are described in Supplementary Materials and methods. Immunoprecipitation of Cdk9 and cyclin T1 was as follows. Testis or HeLa cell extracts were used for immunoprecipitations with anti-Cdk9 and anti-cyclin T1 rabbit polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Lysis, immunoprecipitation and washes were performed in LSDB500 buffer (HEPES 50 mM pH 8, MgCl₂ 3 mM, KCl 250 mM, Glycerol 20%, NP-40 1%, Complete Protease inhibitor EDTA-free Roche). Bound proteins were migrated on 4–12% Bis-Tris SDS PAGE (NuPAGE Precast gel, Invitrogen), transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond C+, GE), and probed with an anti-*Brdt* rabbit polyclonal antibody (produced against *Brdt* C-terminal peptide), as well as with anti-Cdk9 and anti-cyclin T1. *Brdt* pull-down tests were performed as described in Huang *et al* (2010).

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

Acknowledgements

ES cells 46C were a gift from Philippe Avner (Institut Pasteur, Paris) and AT1 cells a gift from Muriel Vernet (CEA, Fontenay-aux-roses, France).

References

- Berkovits BD, Wang L, Guarnieri P, Wolgemuth DJ (2012) The testis-specific double bromodomain-containing protein BRDT forms a complex with multiple spliceosome components and is required for mRNA splicing and 3'-UTR truncation in round spermatids. *Nucleic Acids Res* **40**: 7162–7175
- Bisgrove DA, Mahmoudi T, Henklein P, Verdin E (2007) Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 13690–13695
- Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* **28**: 82–86
- Dhar S, Thota A, Rao MR (2012) Insights into role of bromodomain, testis-specific (*Brdt*) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling in mammalian spermiogenesis. *J Biol Chem* **287**: 6387–6405
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM (1996) Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3264–3268
- Florence B, Faller DV (2001) You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci* **6**: D1008–D1018
- Garcia BA, Hake SB, Diaz RL, Kauer M, Morris SA, Recht J, Shabanowitz J, Mishra N, Strahl BD, Allis CD, Hunt DF (2007) Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *J Biol Chem* **282**: 7641–7655
- Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S (2010) From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* **277**: 599–604
- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**: 3459–3469

The *Brdt* tap-tag project was initiated in the frame of the ANR-REGULOME consortium in SK and MG laboratories. Paraffin embedding and histology sections were performed on the histology platform of Grenoble Medical School. The *Brdt* project is supported by ANR EpiSperm1&2 grants and its cancer oriented developments by INCA-DHOS and 'ARC libre' funds. JG was a recipient of a PhD fellowship by 'Région Rhône-Alpes' 'cible' grant to SR and ARC fellowship for his fourth year. SR and SK are recipients of a 'contrat d'interface' from INSERM-Aviesan. FB was a recipient of 'contrat jeune chercheur' (INSERM, from 2006 to 2011). DJW's contribution is supported by NIH R01 GM081767 grant. We wish to thank Bin Berkovits (from DJW's laboratory) for critical reading of the manuscript. High-throughput sequencing performed at TGML Platform, supported by grants from IBISA and Université de la Méditerranée.

Author contributions: SK and SR initiated and coordinated the entire project, specific author's contributions and wrote the manuscript. SR directed the bioinformatics analyses. JG carried out all the characterizations of the three mouse models used. FB generated vectors for recombineering and established *Brdt*^{+/tag} ES cells. PH, SJ and ADepaux carried out the generation of chimeric mice. The recombineering, ES cell and chimeric mice generation were performed in MG laboratory under his supervision. ALV and TB ensured mouse genotyping and animal handling. EM and TB performed spermatogenic cell fractionation and ChIP experiments. SC prepared vectors and performed the FRET experiments. SC and SB performed the peptide pull-down experiments. PG managed the illumina transcriptomic platform and analysed the raw data. KP performed the EM analysis. ADebernardi performed bioinformatics analyses under the supervision of SR. HH and FL performed ChIP sequencing and raw data analyses, respectively, and JI supervised these analyses and ensured the management of the TGML/TAGC sequencing platform. DJW provided the *Brdt* Δ BD1 mice, discussed the experiments and helped writing the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

- Govin J, Dorsey J, Gaucher J, Rousseaux S, Khochbin S, Berger SL (2010) Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis. *Genes Dev* **24**: 1772–1786
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, Caron C (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* **176**: 283–294
- Govin J, Lestrat C, Caron C, Pivrot-Pajot C, Rousseaux S, Khochbin S (2006) Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. In *The Histone Code and Beyond*, Berger SL, Nakanishi O, Haendler B (eds) pp 155–172. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Hazzouri M, Pivrot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**: 950–960
- Huang R, Holbert MA, Tarrant MK, Curtet S, Colquhoun DR, Dancy BM, Dancy BC, Hwang Y, Tang Y, Meeth K, Marmorstein R, Cole RN, Khochbin S, Cole PA (2010) Site-specific introduction of an acetyl-lysine mimic into peptides and proteins by cysteine alkylation. *J Am Chem Soc* **132**: 9986–9987
- Kotaja N, Kimmins S, Brancorsini S, Hentsch D, Vonesch JL, Davidson I, Parvinen M, Sassone-Corsi P (2004) Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods* **1**: 249–254
- Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth DJ (1998) Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet* **20**: 377–380
- Liu P, Jenkins NA, Copeland NG (2003) A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* **13**: 476–484

- Matzuk MM, McKeown MR, Filippakopoulos P, Li Q, Ma L, Agno JE, Lemieux ME, Picaud S, Yu RN, Qi J, Knapp S, Bradner JE (2012) Small-molecule inhibition of BRDT for male contraception. *Cell* **150**: 673–684
- Moriniere J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-Lopez M, Curtet S, Vitte AL, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ, Krijgsvelde J, Khochbin S, Muller CW, Petosa C (2009) Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**: 664–668
- Muller M, Filippakopoulos P, Knapp S (2011) Bromodomains as therapeutic targets. *Exp Rev Mol Med* **13**: 1–21
- Nickerson HD, Joshi A, Wolgemuth DJ (2007) Cyclin A1-deficient mice lack histone H3 serine 10 phosphorylation and exhibit altered aurora B dynamics in late prophase of male meiosis. *Dev Biol* **306**: 725–735
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by Brdt, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**: 5354–5365
- Rousseaux S, Reynoird N, Escoffier E, Thevenon J, Caron C, Khochbin S (2008) Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online* **16**: 492–503
- Sanchez R, Zhou MM (2009) The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Dev* **12**: 659–665
- Sasaki K, Ito T, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M (2009) Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 16257–16262
- Sassone-Corsi P (2002) Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* **296**: 2176–2178
- Schroder S, Cho S, Zeng L, Zhang Q, Kaehlcke K, Mak L, Lau J, Bisgrove D, Schnolzer M, Verdin E, Zhou MM, Ott M (2012) Two-pronged binding with bromodomain-containing protein 4 liberates positive transcription elongation factor b from inactive ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem* **287**: 1090–1099
- Shang E, Nickerson HD, Wen D, Wang X, Wolgemuth DJ (2007) The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* **134**: 3507–3515
- Shang E, Salazar G, Crowley TE, Wang X, Lopez RA, Wolgemuth DJ (2004) Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis. *Gene Expr Patterns* **4**: 513–519
- Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A (2011) A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* **474**: 337–342
- Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**: 1016–1028
- Ye T, Krebs AR, Choukrallah MA, Keime C, Plewniak F, Davidson I, Tora L (2010) seqMINER: an integrated ChIP-Seq data interpretation platform. *Nucleic Acids Res* **39**: e35
- Zhang K, Williams KE, Huang L, Yau P, Siino JS, Bradbury EM, Jones PR, Minch MJ, Burlingame AL (2002) Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **1**: 500–508
- Zhao R, Nakamura T, Fu Y, Lazar Z, Spector DL (2011) Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation. *Nat Cell Biol* **13**: 1295–1304