



Etude génomique de la cohorte nationale de leucémies dérivées de cellules dendritiques plasmacytoïdes et hémopathies apparentées

Florian Renosi

► To cite this version:

Florian Renosi. Etude génomique de la cohorte nationale de leucémies dérivées de cellules dendritiques plasmacytoïdes et hémopathies apparentées. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCE001 . tel-03532376

HAL Id: tel-03532376

<https://theses.hal.science/tel-03532376>

Submitted on 18 Jan 2022

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

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

**THÈSE DE DOCTORAT DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ
PRÉPARÉE A L'UNITÉ MIXTE DE RECHERCHE 1098 - RIGHT**

Ecole doctorale n°554

Environnement - Santé

Doctorat de médecine, cancérologie, génétique, hématologie, immunologie

Département Biologie, médecine et santé

Par

Florian Renosi

**ETUDE GÉNOMIQUE DE LA COHORTE NATIONALE DE LEUCÉMIES DÉRIVÉES DE CELLULES DENDRITIQUES
PLASMOCYTOÏDES ET HÉMOPATHIES APPARENTÉES**

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 12 janvier 2021

Composition du Jury :

M. Claude PREUDHOMME	Professeur des Universités et Praticien Hospitalier INSERM UMR-S-1172, Univ Lille 2, CHRU Lille, Lille	Président du jury
Mme Valérie BARDET	Professeure des Universités et Praticienne Hospitalière INSERM UMR1184, Univ Paris Saclay, Hôpital Ambroise Paré, Paris	Rapporteuse
M. Laurent MAUVIEUX	Professeur des Universités et Praticien Hospitalier INSERM U1113 IRFAC, Univ Strasbourg, Hôpitaux Strasbourg, Strasbourg	Rapporteur
Mme Francine GARNACHE-OTTOU	Professeure des Universités et Praticienne Hospitalière INSERM UMR1098-RIGHT, UFC, EFS BFC, Besançon	Directrice de thèse
M. Christophe FERRAND	Chercheur – Directeur de laboratoire INSERM UMR1098-RIGHT, UFC, EFS BFC, Besançon	Co-directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mes deux rapporteurs, les Professeurs Valérie Bardet et Laurent Mauvieux. Vous me faites l'honneur de participer à ce jury de thèse et d'apporter votre expertise dans les domaines des hémopathies myéloïdes, des signalisations moléculaires et de la génétique onco-hématologique.

Merci au Professeur Claude Preudhomme, vous me faites l'honneur d'intégrer ce jury. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire à la fin de mon internat, où j'ai énormément appris sur la biologie moléculaire des hémopathies. Je vous remercie pour les échanges que nous avons eus depuis, très constructifs au cours de mes comités de suivi de thèse, et je ne doute pas que vos commentaires sur ce travail seront précieux. Je vous remercie aussi pour les collaborations que nous continuons à nouer.

Je tiens aussi à remercier le Dr Christophe Ferrand, merci pour ton aide précieuse dans le domaine de la génétique et de la biologie moléculaire. Tu m'as apporté les solutions techniques dont j'avais besoin aux moments opportuns. Merci aussi pour mon intégration au laboratoire d'onco-hématologie, pour ta disponibilité au quotidien, quelle que soit la problématique.

Bien sûr, je veux particulièrement remercier le Professeur Francine Garnache-Ottou, merci de m'avoir accueilli dans ton équipe de recherche « LPDC ». Je te remercie pour ces 3 années, pendant lesquels tu m'as guidé, tu m'as initié à ta thématique de recherche et tu m'as fait confiance pour ce projet de thèse qui est l'aboutissement de travaux qui te tiennent à cœur, j'espère avoir su m'approprier ces thématiques. Je te remercie aussi pour ton encadrement et ton soutien dans mon projet professionnel.

Les projets de recherche présentés ici sont le fruit d'un travail collectif, et je tiens à remercier en particulier le Dr. Christophe Roumier, qui m'a beaucoup appris sur l'analyse des données transcriptomiques et Anne Roggy, pour tes analyses dans le domaine, elles m'ont dévoilé les pistes à suivre dans l'étude sur les LPDC. Merci aussi à Loria, tu as ouvert le projet LAM-pDC, pour lequel on a travaillé conjointement, sans rien lâcher. Ces travaux ont aussi été alimentés par l'U1245, notamment le Pr. Fabrice Jardin, le Dr. Philippe Ruminy et Pierre-Julien Vially, dans les domaines de la bioinformatique et de la biologie moléculaire.

Je remercie tous ceux que j'ai pu cotoyer à l'UMR1098, mais tout particulièrement le Pr. Philippe Saas, merci pour vos interrogations et remarques toujours très constructives. Merci pour votre accompagnement lors des comités de suivi de thèse et à chaque occasion de se croiser, merci pour votre sollicitude et votre aide.

Merci beaucoup Sabeha, pour ton aide en cytométrie, dans l'organisation des tris cellulaires, dans la gestion de la cohorte (base de données ?), et pour tout un tas de choses difficile à énumérer ! Merci pour ton amitié surtout ! Merci Laurie et Chrystel, mes co-docs qui ont apporté du soleil dans le bureau et lors des pauses déjeuner (promis on se fait un web-apéro bientôt!). Au fait, les pauses déjeuner ? J'espère retrouver rapidement ces moments sans prise de tête avec Laura, Justine, Laurie S, Myriam, Syrine, Romain, Yann, et tous ceux qui prennent plaisir à s'y greffer ! Margaux et Maxime, merci pour vos modèles murins, vos supers figures... vos galères, Dobby et vos chocolats aussi, merci ! Aux internes qui ont alimenté les projets LPDC, merci à Lou, Blandine et Samantha. Fanny, merci pour ta proximité, Elodie pour ta complicité de jeune parent et pour ces moments avec les anciens du bureau « moquette ». Anne, Clémentine et Samira, c'est toujours un plaisir de vous voir, Anne merci pour ton aide en bio mol, je n'ai jamais hésité à en profiter, il faut bien l'avouer !

Je voudrais aussi remercier spécialement Sarah et Justine, merci pour votre aide à chaque fois que j'en ai besoin, même à la dernière minute ! Il y a aussi les collègues du staff thérapie cellulaire ! Je dois reconnaître ma désaffection de cet équipage ces derniers mois, mais je ne vous oublie pas non plus ! Jeanne, Patricia, la team IL1-RAP avec Mathieu (le NGS et ses angoisses, la complexité des couleurs primaires), Lucie, Clémentine N, Walid, Rafik, Rim et Marina. Merci à Olivier Adotevi, de coordonner tout ce bel univers TIM-C, avec exigence mais toujours dans la bonne humeur. Je voudrais aussi remercier la plateforme de cytométrie de Dijon, Annabelle, Serge et Nicolas, merci pour vos efforts et votre gentillesse ! Merci aussi aux Dr. Romain Boidot et Eric Hervouet, au Pr. Jacques Colinge et à Ambre Giguelay, pour votre aide en transcriptomique et pour votre confiance dans le projet FreGATE-pDC qui commence.

L'EFS c'est aussi Cécile, Claudine et Véronique pour votre investissement, vos avis et pour toute l'expérience que vous partagez. Cette motivation est contagieuse, et ça fait plaisir de voir arriver Claire et Emmanuelle avec le même état d'esprit. Je voudrais aussi remercier Anne (à nouveau), Sandrine, Valérie, Fabien, Thomas, Khan, Clément, Rachel et Guillaume pour vos conseils, votre aide, et les pauses déjeuner, sans café, désolé. Merci aussi à toutes ces personnes géniales que je croise à l'EFS, mention spéciale aux filles de la plateforme et aux sportifs de Diakone.

Un petit retour en arrière, et un mot pour ceux qui m'ont amené à la recherche. Je me rends compte que cela a beaucoup compté : merci au Dr. Françoise Bienvenu, aux Pr. Soumeia Bekri et Olivier Boyer, et à Jérémie de m'avoir associé à vos projets. Aux lillois, qui ont forgé mes dernières armes avant la bataille : Nathalie, Thomas, Nicolas, Alice, ainsi que Laurène et Gauthier qui ont partagé ces moments, quel plaisir de bosser dans cette ambiance ! Pour tout ce que j'ai appris à vos côtés en génétique : merci à Pascaline, Dominique et à toute l'équipe du Centre Henri Becquerel !

A mes parents et à mon frère, je vous remercie pour tout votre amour et pour votre soutien. A Véronique, merci pour votre soutien et vos petites attentions. A Didier, c'est maintenant une évidence, on va rester amis au moins encore aussi longtemps que depuis qu'on se connaît (au moins !). A ma famille rouennaise : les berbies, les paquitos, la molkky, même si les occasions de se voir se font rares, on se retrouve chaque fois comme si on ne s'était jamais quittés. Aux amis bisontins, vivement un bon barbecue pour se retrouver (quand on pourra...), avec Rose-Marie, Maria, Vincent, Henry, Romain s'il faut en citer quelques-uns ! Mylène et Thomas aussi bien sûr !

A Jennifer, qui supporte (aime ?) mon sale caractère, tu me fais tellement rire ! Merci d'avoir déniché une troisième petite personne pour qu'on rie ensemble au quotidien.

Loi de Hofstadter, de glissement de planning

« Il faut toujours plus de temps que prévu, même en tenant compte de la loi de Hofstadter. »
"It always takes longer than you expect, even when you take into account Hofstadter's Law."

Douglas Hofstadter, *Gödel, Escher, Bach: An Eternal Golden Braid* (1979, Prix Pulitzer 1980)

Table des Matières

Remerciements	3
Table des Matières	1
Table des illustrations	4
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations	6
Lexique des gènes	7
Introduction	9
I. Hématopoïèse physiologique	10
A. Rappels sur l'hématopoïèse	10
B. Les lignées dendritiques	11
C. Les cellules dendritiques plasmocytoïdes	13
1. Premières descriptions de pDCs	13
1.1. Les interférons de type I	13
1.2. Les pDCs, des cellules productrices naturelles d'IFN de type I	13
2. Marqueurs phénotypiques des pDCs	15
2.1. Marqueurs spécifiques des pDCs	15
2.2. Stades de maturation des pDCs médullaires	17
3. Différenciation et programme transcriptionnel des pDCs	19
3.1. Programme transcriptionnel	19
3.2. Une origine myéloïde ou lymphoïde des pDCs	20
3.3. Place des pDCs thymique dans l'hématopoïèse	21
D. Les cellules dendritiques AXL ⁺ SIGLEC6 ⁺	22
1. Première description	22
2. Marqueurs phénotypiques	23
3. Place des AS-DCs par rapport aux cDCs et aux pDCs	24
4. Une origine myéloïde ou lymphoïde incertaine	24
E. Bilan des populations dendritiques chez l'Homme	25
II. Onco-hématologie	27
A. Classification actuelle des hémopathies	27
1. Leucémies aiguës myéloïdes et lymphoblastiques	27
2. Lymphomes Non Hodgkiniens	28
3. Hémopathies à pDCs	28
B. Leucémies dérivées de pDC : les néoplasies à pDCs blastiques	30
1. Epidémiologie	30
2. Présentation clinique	30
3. Diagnostic histologique et biologique	31
3.1. Examens anatomopathologiques	31
3.2. Examens cytologiques	32
3.3. Marqueurs utilisés en immunohistochimie et en cytométrie en flux	33

4.	Diagnostic différentiel	35
C.	Prolifération de pDCs matures associées à une hémopathie	36
1.	Définition	36
2.	Hémopathies associées	36
3.	Caractère néoplasique des pDCs	36
4.	Maturation continue des myéloblastes vers les pDCs matures	37
III.	Génétique somatique en onco-hématologie	38
A.	Anomalies génétiques en onco-hématologie	38
1.	Modèle de leucémogénèse en 2 étapes	38
2.	Autres catégories de gènes impactés	39
3.	Modèle de leucémogénèse multi-étapes	40
3.1.	Mutations préleucémiques	40
3.2.	Anomalies liées à la transformation et mutations de progression	41
3.3.	Impact pronostique	42
B.	Anomalies génétiques dans les leucémies dérivées de pDC	43
1.	Profil transcriptionnel	43
2.	Anomalies génétiques	44
2.1.	Anomalies myéloïde-like : altérations épigénétiques et du spliceosome	44
2.2.	Anomalies de facteurs de transcription	45
2.3.	Réarrangements de MYC	45
2.4.	Réarrangements de MYB	45
2.5.	Délétions de NR3C1	47
2.6.	Altérations de gènes suppresseurs de tumeurs ou impliqués dans le cycle cellulaire	47
2.7.	Profil génétique global	48
C.	Anomalies génétiques dans les proliférations de pDCs matures	49
1.	LAM-pDC	49
2.	LMMC-pDC	49

Objectifs **51**

I. Rationnel scientifique **51**

II. Objectifs de l'étude **51**

Partie I : Etude des leucémies dérivées de pDC **53**

I. Matériel et méthodes **53**

A.	Matériel biologique et analyse phénotypique	53
1.	Matériel biologique	53
2.	Analyse phénotypique	53
B.	Analyse moléculaire	54
1.	Analyse transcriptomique	54
2.	Etude de variation du nombre de copies	54
3.	Séquençage haut débit (NGS) ciblé	54
4.	Recherche de transcrits de fusion impliquant MYB par LD-RT PCR	56

II. Résultats	59
A. Article 1 : “Transcriptomic and genomic heterogeneity in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasms: from ontogeny to oncogenesis”	59
B. Recherche de transcrits de <i>MYB</i> et <i>MYBL1</i> par LD-RT PCR	85
III. Discussion	87
A. Voies dérégulées	87
B. Une ontogénie incertaine	88
C. Améliorer le diagnostic	89
D. Différents sous-types de LPDC ?	90
E. Développement de nouvelles approches thérapeutiques	92
F. Micro-environnement tumoral	94
Partie II : Etude des LAM - pDC	97
I. Matériel et méthodes	97
A. Matériel biologique et analyse phénotypique	97
1. Matériel biologique	97
2. Analyse phénotypique	97
B. Analyse moléculaire	97
1. Tri cellulaire préalable	97
2. Séquençage haut débit (NGS) ciblé	97
II. Résultats	99
Article 2 : étude des LAM-pDC : “Plasmacytoid dendritic cells proliferation associated with acute myeloid leukemia: phenotype profile and mutation landscape”	99
III. Discussion	127
A. Profil phénotypique et potentiel de maturation	127
B. Mutations de <i>RUNX1</i>	128
C. Ontogénie pDCs canoniques ou AS-DCs	129
D. Impact clinique et pronostique	130
E. Dérégulation immunitaire	130
F. Nouvelles approches thérapeutiques	131
G. Perspectives	131
Conclusion	132
Bibliographie	133
Résumé	152
Abstract	152

Table des illustrations

FIGURE 1 : MODELE DE DIFFERENCIATION HEMATOPOÏETIQUE	10
FIGURE 2 : PHENOTYPE DES DCs HUMAINES D'APRES MERAD <i>ET AL.</i> , 2013 ⁸	12
FIGURE 3 : FONCTIONS IMMUNITAIRES DES pDCs D'APRES SWIECKI AND COLONNA, 2015, NAT REV IMMUNOL ²²	14
FIGURE 4 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES MEMBRANAIRES DES pDCs CHEZ L'HOMME D'APRES COLLIN <i>ET AL.</i> , 2018 ⁴⁵	15
FIGURE 5 : FACTEURS INFLUENCANT LA MIGRATION DES pDCs D'APRES SWIECKI AND COLONNA, 2015, NAT REV IMMUNOL ²²	16
FIGURE 6 : EVOLUTION D'EXPRESSION DE DIFFERENTS MARQUEURS AU COURS DU DEVELOPPEMENT MEDULLAIRE DES PRE-pDCs, D'APRES MARTIN-MARTIN <i>ET AL.</i> , 2009 ⁴⁶	17
FIGURE 7 : EXPRESSION DU CD304 ET DU CD303 EN COURS DE MATURATION DES PRE-pDCs D'APRES MARTIN-MARTIN <i>ET AL.</i> , 2009 ⁴⁶	18
FIGURE 8 : DEVELOPPEMENT ET DIFFERENCIATION DES pDCs D'APRES SWIECKI AND COLONNA, 2015 ²²	19
FIGURE 9 : CONTROLE TRANSCRIPTIONNEL DE LA DIFFERENCIATION ENTRE pDCs ET cDCs, D'APRES REIZIS <i>ET AL.</i> , 2019 ⁶⁰	20
FIGURE 10 : MODELE MURIN D'ONTOGENIE DES DCs D'APRES DRESS <i>ET AL.</i> , 2019 (SUPPL FIG7) ⁷⁴	21
FIGURE 11 : POPULATIONS MONOCYTAIRES ET DENDRITIQUES DECRITES PAR VILLANI <i>ET AL.</i> , 2017 ⁵⁸	22
FIGURE 12 : EXPRESSION DE MARQUEURS DIFFERENTIELS DES AS-DCs DANS LES DCs HUMAINES, ADAPTE DE VILLANI <i>ET AL.</i> , 2017 ⁵⁸	23
FIGURE 13 : STRATEGIE DE SELECTION ET HETEROGENEITE DES AS-DCs D'APRES VILLANI <i>ET AL.</i> , 2017 ⁵⁸	24
FIGURE 14 : MODELE DE DIFFERENCIATION HEMATOPOÏETIQUE INTEGRANT LES pDCs CANONIQUES ET LES AS-DCs	26
FIGURE 15 : MORPHOLOGIE REPRESENTATIVE DES BLASTES DE LPDC D'APRES GARNACHE <i>ET AL.</i> , 2019 ⁹⁸	32
FIGURE 16 : ALGORITHME PROPOSE EN 2009 POUR LE DIAGNOSTIC DES LPDC, GARNACHE <i>ET AL.</i> , 2009 ⁹⁷	33
FIGURE 17 : CRITERES DIAGNOSTIQUES D'UNE LPDC, GARNACHE <i>ET AL.</i> , 2007 ¹⁵⁰	34
FIGURE 18 : MATURATION PROGRESSIVE DE MYELOBLASTES DE LAM EN pDCs	37
FIGURE 19 : MODELE DE LEUCEMOGENESE DES LA EN 2 ETAPES, ADAPTE DE KELLY <i>ET AL.</i> , 2002 ¹⁸⁴	38
FIGURE 20 : PRINCIPALES CATEGORIES DE GENES MUTES DANS LES LAM, ADAPTE DE DÖHNER <i>ET AL.</i> , 2015 ¹⁹⁰	39
FIGURE 21 : PREVALENCE DES MUTATIONS SOMATIQUES EN FONCTION DE L'AGE, D'APRES JAISWAL <i>ET AL.</i> , 2014 ²⁰⁰	40
FIGURE 22 : ILLUSTRATION DE LA DIVERSITE DES ANOMALIES RETROUVEES DANS LES LAM DE L'ADULTE, D'APRES DÖHNER <i>ET AL.</i> , 2017 ²⁰¹	41
FIGURE 23 : GENES FREQUEMMENT MUTES DANS LES LPDC ET LEURS ASSOCIATIONS, D'APRES MENEZES <i>ET AL.</i> , 2014 ¹³³	44
FIGURE 24 : RESEAU D'INTERACTIONS ENTRE MYB, MYC ET LEURS CIBLES GENIQUES	46
FIGURE 25 : COURBES DE SURVIE CUMULATIVE DE KAPLAN-MEIER EN FONCTION DU STATUT NR3C1, D'APRES EMADALI <i>ET AL.</i> , 2016 ¹³⁶	47
FIGURE 26 : ANOMALIES GENETIQUES DANS LES LEUCEMIES DERIVEES DE pDC	48
FIGURE 27 : PROFIL MUTATIONNEL DES MONOCYTES ET pDCs DE 10 LMMC, D'APRES LUCAS <i>ET AL.</i> , 2019 ⁵⁵	49
FIGURE 28 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ESSAI LD-RT PCR D'APRES RUMINY <i>ET AL.</i> , 2016 ²⁴⁵	56
FIGURE 29 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE LD-RT PCR (LIGATION-DEPENDENT REVERSE-TRANSCRIPTASE PCR)	57
FIGURE 30 : DESIGN LD-RT PCR MYB, MYBL1 ET NR3C1	58
FIGURE 31 : PROFILS OBTENUS PAR LD-RT-PCR MYB/MYBL1/NR3C1	85
FIGURE 32 : IDENTIFICATION DE 2 GROUPES POTENTIELS DE LEUCEMIES DERIVEES DE pDC	90
FIGURE 33 : COLLABORATION ACADEMIQUE DANS LE CADRE DU PROJET FREGATE-PDC (PRT-K19-069)	91
FIGURE 34 : APPROCHES THERAPEUTIQUES ENVISAGEES DANS LES LPDC, D'APRES ZHANG <i>ET AL.</i> , 2020 ²⁶⁷	93
FIGURE 35 : LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE : PRINCIPALES MOLECULES IMMUNE CHECKPOINTS DANS LES LAM	94
FIGURE 36 : ANALYSE PAR CIBERSORT DES DONNEES DE TRANSCRIPTOMIQUE DES 13 LPDC	95
FIGURE 37 : MODELE DE MATURATION DES LAM-pDC	127
FIGURE 38 : MECANISME DE COMPENSATION GENETIQUE DU NIVEAU GLOBAL DE LA FAMILLE RUNX, D'APRES KAMIKUBO <i>ET AL.</i> , 2018 ²⁸⁹	128
FIGURE 39 : LES pDCs DANS LES LMMC-pDC SONT DES pDCs CANONIQUES ET PAS DES AS-DCs, D'APRES LUCAS <i>ET AL.</i> , 38 ^{EME} CONGRES DE LA SOCIETE FRANÇAISE D'HEMATOLOGIE, 2018	129

FIGURE 40 : ROLE PRESUME DES PDCs DANS LA LMC D'APRES INSELMANN <i>ET AL.</i> , 2018 ¹⁷⁴	130
FIGURE 41 : ETUDE CONJOINTE DES LAM0 ET DES LAM MUTEES POUR RUNX1 A LA RECHERCHE DE LAM-PDC.....	131

Liste des tableaux

TABEAU 1 : DIFFERENTS SOUS-TYPES DE CELLULES DENDRITIQUES CHEZ L'HOMME	25
TABEAU 2 : CLASSIFICATION SIMPLIFIEE DES HEMOPATHIES MALIGNES	27
TABEAU 3 : CLASSIFICATION OMS DES HEMOPATHIES, ADAPTE DE ARBER <i>ET AL.</i> , 2016 ⁹¹	29
TABEAU 4 : CLASSIFICATION OMS DES LAM ET DES LAL-B AVEC ANOMALIES RECURRENTES, ET STRATIFICATION PRONOSTIQUE DES LAM SELON L'ELN	42
TABEAU 5 : PANEL DE GENES DU DESIGN HALOPLEX ^{HS} TARGET ENRICHMENT SYSTEM POUR ILLUMINA DANS LES LPDC.....	55
TABEAU 6: PANEL DE CYTOMETRIE EN FLUX POUR L'ANALYSE DES ECHANTILLONS DE LPDC.....	95
TABEAU 7 : PANEL DE GENES DU DESIGN HALOPLEX ^{HS} TARGET ENRICHMENT SYSTEM POUR ILLUMINA DANS LES LAM-PDC	98

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique	MPO: Myéloperoxydase
Ag : Antigène	MRD: <i>Minimal Residual Disease</i>
ALFA : <i>Acute Leukemia French Association</i>	NGS : <i>Next-Generation Sequencing</i>
AML : <i>Acute Myeloid Leukemia</i>	NK : Cellule <i>Natural Killer</i>
ARN : Acide RiboNucléique	NPC : <i>Natural IFN-I Producing Cell</i>
AS-DC : cellules dendritiques AXL ⁺ SIGLEC6 ⁺	NSG : <i>NOD/SCID/IL2Rγc-deficient</i>
BDCA : <i>Blood Dendritic Cell Antigen</i>	NSGS : <i>NSG expressing human IL3, GM-CSF and SCF</i>
BET : Bromodomain Extra-Terminal	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
BPDCN : <i>Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm</i>	PBMC : <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
CBF : <i>core binding factor</i>	PCR : <i>Polymerase Chain Reaction</i>
cDC : Cellules Dendritiques conventionnelles	pDC : Cellules Dendritiques plasmocytoïdes
CDP : <i>Common Dendritic Progenitor</i>	pILC : <i>plasmacytoid Innate Lymphoid Cell</i>
CHIP : <i>Clonal Hematopoiesis Indeterminate Potential</i>	PRRs : <i>Pattern-Recognition Receptors</i>
CMF : Cytométrie en flux	RNA-seq : séquençage haut débit ARN (transcriptome)
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	SMD : Syndrome MyéloDysplasique
CMP : <i>Common Myeloid Progenitor</i>	SMP : Syndrome MyéloProlifératif
CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène	SNC : Système Nerveux Central
CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques	SNP : <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
DC: Cellule Dendritique	TLR : <i>Toll-Like Receptors</i>
ELN : <i>European LeukemiaNet</i>	WES : <i>Whole Exome Sequencing</i>
Eo/BaP : <i>Eosinophile/Basophile Progenitor</i>	
ETP : <i>Early T-cell Precursor</i>	
FAB : <i>French-American-British</i>	
FISH : <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>	
FPD: <i>Familial Platelet Disorder</i>	
GM-CSF : <i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>	
GMP : <i>Granulocyte-Macrophage Progenitor</i>	
GSEA : <i>Gene Set Enrichment Analysis</i>	
HLA : <i>Human Leukocyte Antigen</i>	
HUGO : <i>Human Genome Organization</i>	
IFN-I : Interféron de type I	
IHC : Immunohistochimie	
ILC : <i>Innate Lymphoid Cell</i>	
IPC : <i>IFN producing cells</i>	
IRF : <i>Interferon regulatory factor</i>	
ITD : <i>Internal Tandem Duplication</i>	
LA: Leucémie Aiguë	
LAL: Leucémie Aiguë Lymphoblastique	
LAM: Leucémie Aiguë Myéloïde	
LB : Lymphocyte B	
LC : Cellules de Langerhans	
LD-RT PCR: <i>Ligation-Dependent Reverse Transcription PCR</i>	
Lin- : <i>Lineage negative</i> ¹	
LMMC : Leucémie MyéloMonocytaire Chronique	
LMPP : <i>Lymphoid primed Multipotential Progenitor</i>	
LNH : Lymphome Non Hodgkinien	
LT : Lymphocyte T	
MDP: <i>Macrophage Dendritic Progenitor</i>	
MEP : <i>Megakaryocyte-Erythroid Progenitor</i>	
MLP : <i>Multi-Lymphoid Progenitor</i>	
MLPA : <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	
MO : Moelle Osseuse	
MPP : <i>MultiPotent Progenitor</i>	
MPDCP : <i>Mature pDC Proliferation</i>	

Lexique des gènes

Gène	Nom complet (nomenclature HGNC*)	Localisation chromosomique
ASXL1	<i>additional sex combs like 1, transcriptional regulator</i>	20q11.21
BCOR	<i>BCL6 corepressor</i>	Xp11.4
BCORL1	<i>BCL6 corepressor-like 1</i>	Xq26.1
CALR	<i>Calreticulin</i>	19p13.13
CBFB	<i>core-binding factor beta subunit</i>	16q22.1
CBL	<i>Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i>	11q23.3
CCND1	<i>cyclin D1</i>	11q13.3
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>	19q13.11
CREBBP	<i>CREB binding protein</i>	16p13.3
CSF3R	<i>colony stimulating factor 3 receptor</i>	1p34.3
DDX41	<i>DEAD-boxhelicase 41</i>	5q35.3
DNMT3A	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha</i>	2p23.3
ETV6	<i>ETS variant 6</i>	12p13.2
EZH2	<i>enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i>	7q36.1
FLT3	<i>fms related tyrosine kinase 3</i>	13q12.2
GATA1	<i>GATA binding protein 1</i>	Xp11.23
GATA2	<i>GATA binding protein 2</i>	3q21.3
IDH1	<i>isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1, cytosolic</i>	2q34
IDH2	<i>isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial</i>	15q26.1
IKZF1	<i>IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)</i>	7p12.2
IKZF2	<i>IKAROS family zinc finger 2 (Helios)</i>	2q34
IKZF3	<i>IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)</i>	17q12
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>	9p24.1
KDM6A	<i>lysine (K) demethylase 6A</i>	Xp11.3
KIT	<i>proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i>	4q12
KMT2A	<i>lysine (K) methyltransferase 2A (MLL mixed lineage leukemia)</i>	11q23.3
KRAS	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>	12p12.1
MPL	<i>MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor</i>	1p34.2
MYB	<i>v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog</i>	6q23.3
MYBL1	<i>v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1</i>	8q13.1
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	8q24.21
MYH11	<i>myosin heavy chain 11</i>	16p13.11
NF1	<i>NF1 neurofibromin 1</i>	17q11.2
NPM1	<i>Nucleophosmin</i>	5q35.1
NR3C1	<i>Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1/glucocorticoid receptor</i>	5q32
NRAS	<i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>	1p13.2
PHF6	<i>plant homeodomain-like finger protein 6</i>	Xq26.2
PML	<i>promyelocytic leukemia</i>	15q24.1
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>	10q23.31
PTPN11	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i>	12q24.13
RARA	<i>retinoic acid receptor alpha</i>	17q21.2
RB1	<i>retinoblastoma</i>	13q14.2
RUNX1	<i>runt related transcription factor 1</i>	21q22.12
RUNX1T1	<i>RUNX1 translocation partner</i>	18q21.3
RUNX2	<i>runt related transcription factor 2</i>	6p21.1
SETBP1	<i>SET binding protein 1</i>	18q12.3
SF3B1	<i>splicing factor 3b subunit 1</i>	2q33.1
SRSF2	<i>serine and arginine rich splicing factor 2</i>	17q25.2
TET2	<i>ten eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2</i>	4q24
TP53	<i>tumor protein p53</i>	17p13.1
U2AF1	<i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1</i>	21q22.3
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>	11p13
ZEB2	<i>zinc finger E-box binding homeobox 2</i>	2q22.3
ZRSR2	<i>zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2</i>	Xp22.2

*HUGO (human genome organization) Gene Nomenclature Committee

Introduction

Les hémopathies malignes impliquant des cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDC) comprennent les leucémies à pDC (LPDC) et les proliférations de pDC matures (PPDCM) associées à une hémopathie. L'étude de ces deux entités repose sur une bonne compréhension des mécanismes physiologiques de différenciation des pDCs. Comme exposé ci-après, l'ontogénie des pDCs est en effet très débattue et complexe, malgré la richesse et la qualité des travaux menés jusqu'à présent. L'existence de ces deux entités constitue également un défi diagnostique au sein des hémopathies, car elles sont rares, de description récente, et elles nécessitent une certaine expertise. Enfin, les anomalies génétiques dans ces hémopathies sont diverses et encore peu décrites, ajoutant une strate de complexité à ces entités rares.

I. Hématopoïèse physiologique

A. Rappels sur l'hématopoïèse

L'hématopoïèse correspond au processus de différenciation progressive de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en cellules sanguines ou tissulaires matures. A partir de CSH pluripotentes, la différenciation hématopoïétique conduit à l'engagement progressif dans divers types cellulaires. Ces CSH expriment le CD34, un marqueur membranaire impliqué dans l'adhérence des CSH au stroma médullaire. Ce marqueur est ensuite perdu au cours de la différenciation hématopoïétique normale et le CD45, exprimé dès le stade des progéniteurs, voit son expression accrue sur la plupart des cellules hématopoïétiques nucléées matures. A partir d'un progéniteur commun myéloïde et lymphoïde (CMLP pour *Common Myeloid Lymphoid Progenitor*), la cellule s'engage soit vers les lignées myéloïdes, soit vers les lignées lymphoïdes, avec cependant des possibilités de perméabilité entre ces deux grands ensembles (Figure 1). De plus, l'existence d'un progéniteur commun lymphoïde (CLP pour *Common Lymphoid Progenitor* ou MLP pour *Multi-Lymphoid Progenitor*), distinct de la lignée myéloïde, mais unique pour les lymphocytes T/NK/B a été remise en cause². En effet, on distingue d'une part les lignées T et NK, et d'autre part les lignées B, qui présentent des caractéristiques et un programme transcriptionnel totalement indépendant, dès les premières étapes de différenciation. Les lymphocytes T (LT) et NK sont impliqués dans l'immunité adaptative via leur cytotoxicité ou la production de cytokines propres à chaque sous-type. Les lymphocytes B (LB) sécrètent des anticorps et sont capables de fonctionner comme cellules présentatrices d'antigènes (CPA). A noter que depuis le début des années 2000, les progéniteurs aussi bien B que T et NK conserveraient des capacités de différenciation myéloïde.^{2,3}

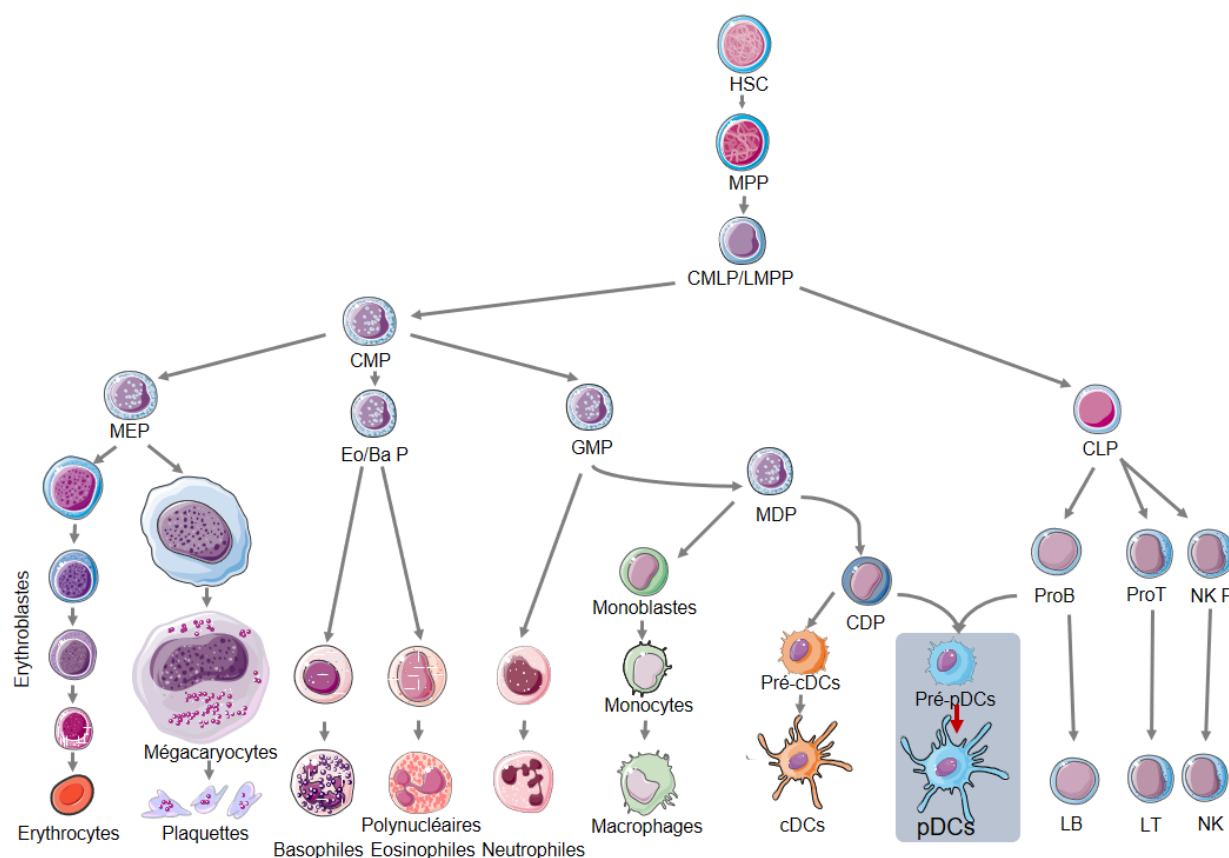


Figure 1 : Modèle de différenciation hématopoïétique

MPP : Multipotent Progenitor ; LMPP : Lymphoid primed Multipotential Progenitor ; MLP : Multi-Lymphoid Progenitor ; CMP : Common Myeloid Progenitor ; LB : Lymphocyte B ; LT : Lymphocyte T ; MEP : Megakaryocyte-Erythroid Progenitor ; Eo/BaP : Eosinophile/Basophile Progenitor ; GMP : Granulocyte-Macrophage Progenitor ; MDP : Macrophage-Dendritic Progenitor ; CDP : Common Dendritic Progenitor.

Au sein des lignées myéloïdes, le progéniteur commun myéloïde (CMP pour *Common Myeloid Progenitor*) donne naissance à des progéniteurs engagés dans les lignées mégacaryo-érythrocytaires (MEP pour *Megakaryocyte Erythroid Progenitor*), dans les lignées éosinophiles et basophiles (Eo/BaP pour *Eosinophile/Basophile Progenitor*) et dans les lignées granuleuses et macrophagiques (GMP pour *Granulocyte Macrophage Progenitor*). La lignée érythroïde permet la production d'érythrocytes assurant des fonctions de transport de l'oxygène dans les vaisseaux sanguins via l'hémoglobine, tandis que la lignée mégacaryocytaire permet de produire des plaquettes nécessaires au maintien d'une hémostasie compétente. Les lignées granuleuses et macrophagiques issues du GMP sont impliquées dans l'immunité innée, notamment grâce à leur activité phagocytaire. Les polynucléaires neutrophiles sont des phagocytes spécialisés, dont les fonctions associées aux neutrophiles, éosinophiles et basophiles sont liées au contenu spécifique de leurs granulations, favorisant une lutte contre les infections bactériennes, parasitaires ou une implication dans les processus immuno-allergiques et histaminergiques. Les monocytes et macrophages forment un groupe très varié de cellules, le système réticulo-histiocytaire (SRH). Ils sont considérés comme le modèle type du phagocyte, avec également un rôle dans l'immunité adaptative, par présentation d'antigènes aux LT et LB et production de cytokines. Ce SRH partage un progéniteur commun macrophage-dendritique (MDP pour *Macrophage Dendritic Progenitor*) avec les cellules dendritiques (DCs).

B. Les lignées dendritiques

Les fonctions immunitaires des lymphocytes sont très largement dépendantes de la présentation d'Antigènes (Ag) par les cellules environnantes. Ces dernières jouent un rôle de CPA, via les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I et II, respectivement pour les LT CD8 et CD4. Plusieurs types cellulaires, d'origine diverses peuvent jouer le rôle de CPA, dont le SRH et les DCs, qui expriment le CMH de classe II. Ces DCs sont notamment les acteurs clé de cette présentation antigénique et de l'induction d'une réponse immunitaire adaptative, au cours du rejet de greffe⁴ ou de la lutte anti-tumorale⁵.

Les DCs ont été décrites pour la première fois en 1973 par Steinman *et al.*, avec une localisation splénique chez la souris⁶. On les caractérise par l'expression des molécules du CMH de classe II (dont HLA-DR), en l'absence d'expression des marqueurs forts d'autres lignées hématopoïétiques (CD3 pour les LT, CD19, CD20 pour les LB, CD14, CD64 pour les monocytes, CD66b pour la lignée granuleuse), c'est-à-dire Lin- pour *Lineage negative*¹. Au sein des DCs, une multitude de sous-population coexistent avec des fonctions diverses, ce qui a complexifié leur description au cours des dernières décennies. De plus, les marqueurs et les localisations de ces DCs ne sont qu'en partie superposables entre la souris et l'Homme, et a compliqué les extrapolations des données obtenues chez la souris. Globalement, la classification historique des DCs s'est basée sur leur localisation histologique, leur origine cellulaire, leurs capacités de migration et leurs fonctions spécifiques. Les DCs ont dans un premier temps été distinguées entre celles d'origine myéloïde (ancienne dénomination mDCs) et d'autres d'origine lymphoïde, les pDCs.

Les mDCs, issues d'un MDP ont été requalifiées de DCs conventionnelles (cDCs), car la dénomination mDCs les opposait aux pDCs d'origine lymphoïde supposée. Cependant, les données ultérieures ont suggéré que les pDCs dériveraient également d'un progéniteur commun dendritique d'origine myéloïde (CDP pour *Common Dendritic Progenitor*), rendant le terme de mDCs impropre pour désigner les DCs non plasmocytoïdes. Au niveau sanguin, on distingue 2 populations de cDCs, celles exprimant le CD141/BDCA-3 (cDC1 CD141⁺) et celles exprimant le CD1c/BDCA-1 (cDC2 CD1c⁺)⁷. Ces sous-populations cDC1 et cDC2 pourraient correspondre à des précurseurs circulants des DCs

tissulaires, avec une plasticité importante d'un sous-type à un autre. On retrouve notamment les cDC1 et cDC2 au niveau des tissus lymphoïdes résidents ganglionnaires et spléniques, tandis que d'autres sous-populations sont représentées au niveau cutané dermique, les cDCs CD14⁺ et les cDCs CD1a⁺, mais aussi au niveau thymique et intestinal⁸. A mentionner également, les cellules de Langerhans (LCs), considérées comme appartenant aux DCs mais d'ontogénie distincte, embryonnaire, avec une localisation uniquement épidermique (Figure 2).

	pDC 	BDCA1+ (CD1c)+ 	BDCA3+ (CD141)+ 	LC 	CD14+ 	CD1a+ 
Phenotype:	Lin⁻ HLA-DR⁺ CD11c^{low} CD1a⁻ CD123^{hi} BDCA2⁺ BDCA4⁺	Lin⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD1a⁻ BDCA1⁺ BDCA3^{+/-} CD11b^{low}	Lin⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD1a⁻ BDCA1⁻ BDCA3⁺ CD11b^{low} CD141⁺ Nect2⁺ Xcr1⁺ Clec9a⁺ Dec205^{hi}	Lin⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD1a⁺ CD14⁻ BDCA1⁺ Langerin⁺ EpCAM⁺ Sirpa⁺ CD11b^{+/-} E-cadherin⁺	Lin⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD1a⁻ CD14⁺ BDCA1⁺ Langerin⁻ EpCAM⁻ DC-SIGN⁺ FXIIIa⁻ CD163⁻	Lin⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD1a⁺ CD14⁻ BDCA1⁺ Langerin⁻ EpCAM⁻ Sirpa⁺ CD11b^{hi}
PRRs:	TLR1⁺, TLR2⁻, TLR3⁻, TLR4⁻, TLR6⁺, TLR7⁺, TLR8⁻, TLR9⁺	ND	TLR1⁺, TLR2⁺, TLR3⁺, TLR4⁻, TLR6⁺, TLR7⁻, TLR8⁺, TLR9⁻	TLR1⁺, TLR2⁺, TLR3^{lo}, TLR4⁻, TLR6⁺, TLR7⁻, TLR8⁻, TLR9⁻	ND	ND
Murine equivalent:	pDC	cDC	CD8⁺ cDC	LC	ND	Dermal DC
Location:	Blood and lymphoid tissue			Epidermis	Dermis	
				Cutaneous tissue		

Figure 2 : Phénotype des DCs humaines d'après Merad *et al.*, 2013⁸.

Le phénotype et la localisation des 6 principaux types de DCs est résumé. LC : cellules de Langerhans ; ND : non déterminé ; PRRs : Pattern-Recognition Receptors.

Globalement, l'hétérogénéité et la plasticité des populations de DCs, tant au niveau sanguin que tissulaire d'un organe à l'autre, chez la souris ou chez l'homme, a rendu leur description et leur classification hardue, avec encore à l'heure actuelle des difficultés de caractérisation, liées aux faibles infiltrats de DCs et aux difficultés d'accès à certains tissus, notamment chez l'Homme. Cette diversité montre néanmoins la diversité des fonctions potentielles de ces cellules et leurs rôles multiples immunitaires de régulation de l'immunité adaptative dans les tissus lymphoïdes secondaires et dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Notamment, les DCs ont la capacité de capturer des Ag exogènes et de migrer sous la dépendance du CCR7 vers les organes lymphoïdes via le système lymphatique où ils présentent ces Ag aux LT CD4⁺ et CD8⁺⁸.

Bien que la distinction entre cDCs et pDCs soit clairement démontrée, il est aujourd'hui reconnu qu'elle n'est pas liée à une origine myéloïde ou lymphoïde, car l'ontogénie des pDCs est complexe avec des perméabilités possibles entre les lignées myéloïdes et lymphoïdes⁹⁻¹¹.

C. Les cellules dendritiques plasmocytoïdes

1. Premières descriptions de pDCs

Les premières descriptions de plasmocytes associés aux zones T ganglionnaires datent de 1958, mais c'est à partir des années 80 que ces cellules correspondant aux pDCs ont été précisément décrites et très rapidement distinguées des autres DCs, sous des dénominations de lymphocytes T plasmocytoïdes puis des monocytes plasmocytoïdes, par analogie morphologique avec les plasmocytes, compte tenu d'un cytoplasme abondant et d'un noyau excentré¹²⁻¹⁴. Au niveau tissulaire, les pDCs ont alors été particulièrement retrouvées au niveau amygdalien et ganglionnaire, avec une accumulation au niveau des sites inflammatoires¹⁴.

1.1. Les interférons de type I

Les interférons de type I (IFN-I) ont été décrits pour la première fois en 1957, en référence à leurs capacités d'interférence avec la réplication virale. Il s'agit de cytokines modulant les voies de signalisation pro-inflammatoires et la présentation de l'Ag. Elles activent également les réponses mémoires des lymphocytes et concourent ainsi à la fois à l'immunité innée et adaptative. Les formes les plus abondantes sont les IFN α et IFN β à activité antivirale très puissante, indispensable au contrôle de la propagation d'une infection aiguë. Cependant, la surproduction d'IFN-I peut également avoir un rôle délétère, immunosuppresseur ou pro-inflammatoire, dans les maladies auto-immunes, des infections aiguës telles que la grippe¹⁵ ou chroniques telles que l'infection par le virus d'immunodéficience humaine¹⁶.

1.2. Les pDCs, des cellules productrices naturelles d'IFN de type I

En parallèle des descriptions de monocytes plasmocytoïdes, des cellules capables de produire de l'IFN-I sans être elles-mêmes infectées par un virus furent décrites et caractérisées par l'expression du CMH de classe II et du CD4^{17,18}. Ces descriptions permirent de comprendre que ces « monocytes plasmocytoïdes » remplissent des fonctions de sécrétion accrue d'IFN-I (IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN ω et IFN τ) au décours d'infections virales, justifiant leur dénomination de « cellules productrices naturelles d'IFN » (IPC pour *IFN producing cells* ou NPC pour *Natural IFN-alpha producing cells*)¹⁹⁻²¹. Bien que de description récente, elles apparaissent comme des cellules clés, faisant le lien entre immunité innée et adaptative²². Les pDCs sont quiescentes dans les organes lymphoïdes secondaires, en l'absence de stimulation. En cas d'infection virale, les pDCs développent alors des capacités exceptionnelles et très rapides de production de tous les sous-types d'IFN-I, avec 60% des ARN messagers de la cellule correspondant aux IFN. Cette production est induite par les *Toll-Like Receptors* (TLR) exprimés à la surface des pDCs qui lient du matériel génétique viral : l'ARN simple brin pour le TLR7 et l'ADN double brin pour le TLR9. La vésicule de phagocytose ainsi formée va induire l'activation du facteur de régulation de l'interféron IRF7 (IRF pour *Interferon regulatory factors*), conduisant à la production d'IFN. Cette sécrétion explosive d'IFN est hautement régulée, en particulier par la fixation d'histamine sur CXCR4²³⁻²⁵.

Après production d'IFN, les pDCs se différencient en CPA, capables d'induire une réponse immunitaire adaptative par interaction avec les LT CD8+ via le CMH de classe I et T CD4 via le CMH de classe II. Ces interactions sont associées à l'expression des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40. L'endocytose de matériel via les TLR va également induire l'activation de la voie NF- κ B et la production d'autres cytokines et chimiokines que l'IFN-I, permettant d'induire l'activation de divers sous-types de lymphocytes (Figure 3). Les pDCs sont ainsi capables d'activer les cellules NK en produisant IFN-I, IL-12 et IL-18. Elles induisent aussi une polarisation Th1 et l'activation des LT CD8+.

L'expression d'IDO et d'ICOSL associée à la production de TGF- β et d'IL-6 promeut la polarisation respectivement des Treg et Th17²⁶, et celle de TNF α et IL-6 la polarisation Th22, tandis que la production d'IFN-I, d'IL-6, de BAFF et APRIL régule l'activation lymphoïde B, et la génération de plasmocytes. Les pDCs sont également capables de produire les chimiokines CCL3, CCL4, CXCL8 et CXCL10 impliquées dans le recrutement immunitaire. Enfin, elles ont des capacités naturelles de sécrétion de granzyme B leur permettant d'assurer une activité cytotoxique²².

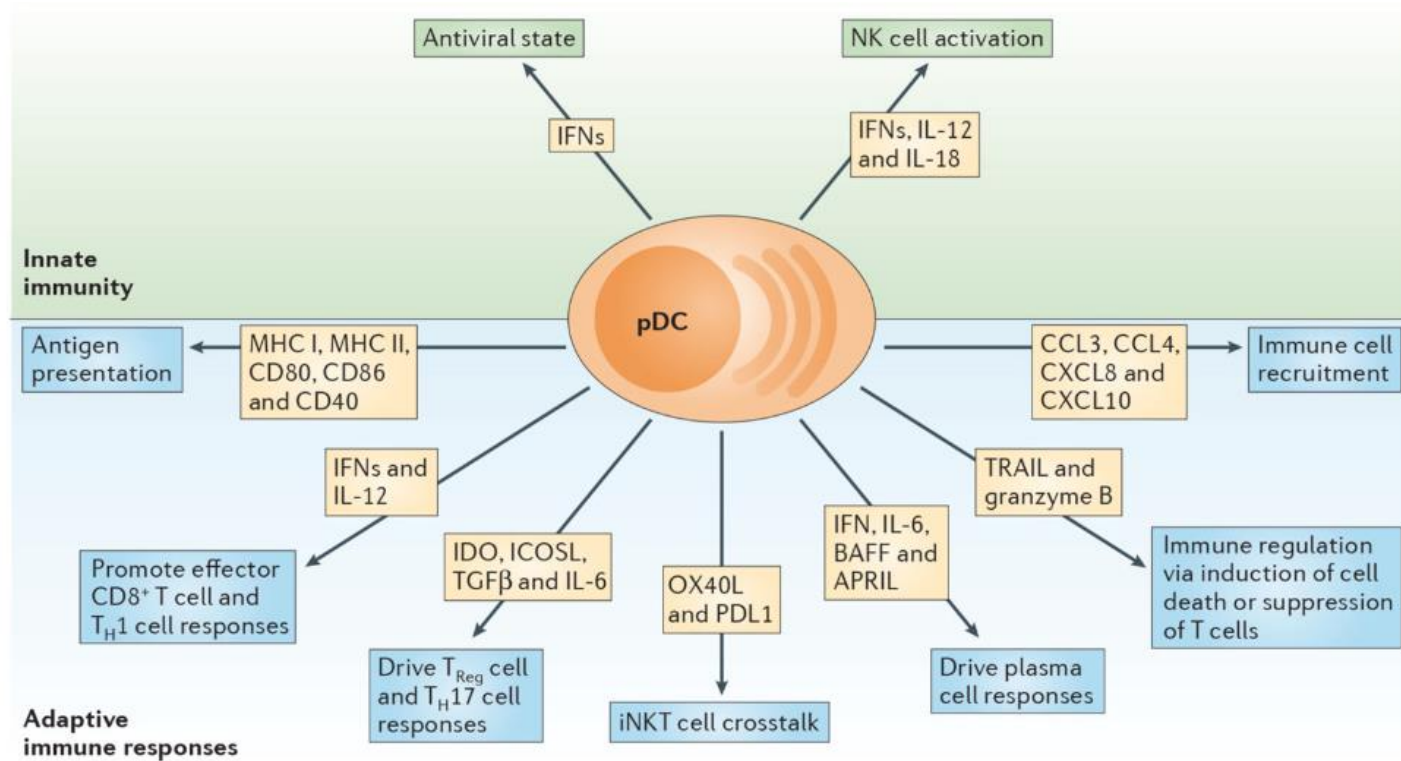


Figure 3 : Fonctions immunitaires des pDCs d'après Swiecki and Colonna, 2015, Nat Rev Immunol²²

Les pDCs sont capables d'induire l'activation de processus immunitaires et de sous-types cellulaires, en particulier lymphocytaires (étiquettes bleues) grâce à la sécrétion d'interleukines, de chimiokines ou l'expression membranaires de molécules de co-stimulation (étiquettes beiges-oranges).

La production d'IFN par activation des TLR est aussi impliquée dans certains contextes pathologiques, notamment dans les maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques telles que le lupus érythémateux systémique pour lesquelles l'activation des pDCs est chronique par reconnaissance d'ADN du soi, le psoriasis, la sclérodermie systémique ou le syndrome de Sjögren²⁷⁻³⁴. C'est aussi le cas dans les réactions immunitaires du greffon contre l'hôte, en association aux LT Th17^{35,36}. Les pDCs jouent également un rôle clé dans l'immunité anti-tumorale, en induisant une tolérance notamment³⁷, avec activation des LT régulateurs³⁸. Le rôle des pDCs dans le microenvironnement tumoral fait actuellement l'objet d'un grand intérêt, et il a notamment été démontré les capacité réduites de production d'IFN-I de ces pDCs intra-tumorales³⁹. Egalement, en onco-hématologie, les pDCs joueraient un rôle important dans le myélome multiple (MM)⁴⁰, constituant une cible thérapeutique potentielle⁴¹.

2. Marqueurs phénotypiques des pDCs

2.1. Marqueurs spécifiques des pDCs

Comme les autres DCs, les pDCs sont réputées ne pas exprimer pas les marqueurs forts des autres lignées hématopoïétiques lymphoïdes B (CD19, CD20), T (CD3 en surface et en intracytoplasmique), NK (CD16, CD57), myéloïdes (CD33, CD13, CD15) ou monocytaires (CD14, CD64), bien qu'une expression faible soit possible, notamment pour le CD33⁴². En revanche, ces cellules expriment fortement le CD123 (IL3RA), à un niveau supérieur aux monocytes, ainsi que le CD4 et HLA-DR à un haut niveau d'expression. A côté de ces marqueurs, les *Blood Dendritic Cell Antigen* (BDCA) correspondent à des marqueurs membranaires permettant de différencier les pDCs, les cDC1 et les cDC2⁷. Comme déjà mentionné, BDCA1 (CD1c) et BDCA3 (CD141) permettent de différencier respectivement les cDC2 des cDC1. En revanche, BDCA-2 et BDCA-4 sont exprimées par les pDCs : BDCA-2 (CD303) est une lectine C codée par le gène CLEC4C⁴³, tandis que BDCA-4 (CD304) correspond à la neuropiline-1 codée par NRP1⁷. D'autres marqueurs sont associés à la lignée pDC dont le CD68 qui n'est pas retrouvé sur les cDCs mais est exprimé sur les monocytes, les CD85k (ILT3 codé par *LILRB4*) et CD85g (ILT7 codé par *LILRA4*)⁴⁴ et des récepteurs à chimiokines (Figure 4).

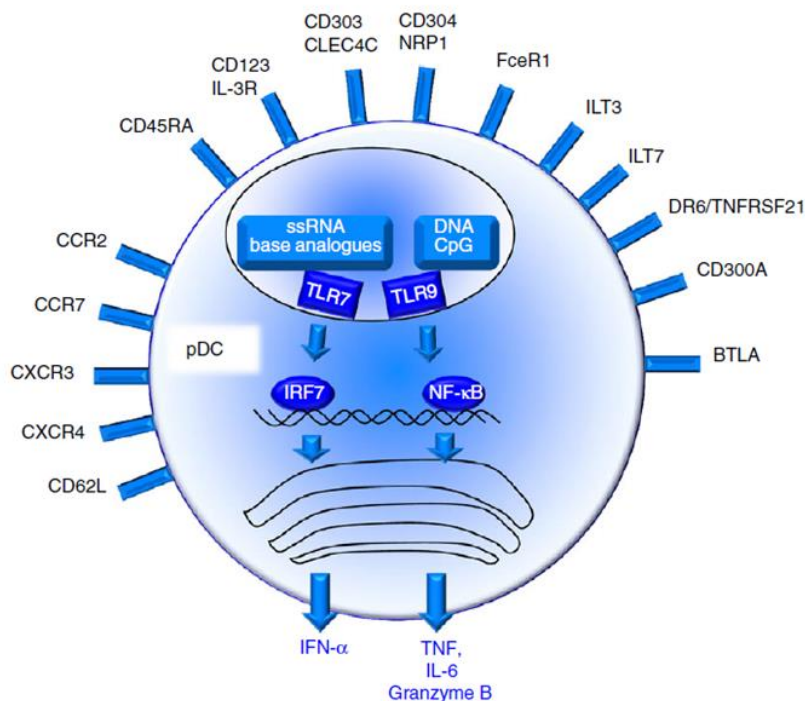


Figure 4 : Principales caractéristiques membranaires des pDCs chez l'Homme d'après Collin et al., 2018⁴⁵

La production d'IFN-I et d'autres cytokines par la pDC est induite par la liaison de matériel génétique aux TLR7/9. Le TLR7 reconnaît l'ARN simple brin des virus à ARN et l'ADN double brin pour le TLR9 reconnaît les motifs CpG hypométhylés des ADN bactériens. *ssRNA* pour *single-strand RNA*, ARN simple brin ; *DNA CpG*, îlots CpG hypométhylés de l'ADN bactérien.

A côté de ces marqueurs communs à toutes les pDCs, certains marqueurs membranaires peuvent être exprimés dans certaines conditions d'activation, ou dans une sous-population de pDCs, illustrant leur hétérogénéité. Les pDCs médullaires immatures expriment ainsi plus fortement le CD33⁴⁶, tandis que le CD2 est exprimé par un sous-type sanguin et amygdalien capable d'activer les LT, exprimant le lysozyme, le CD5 et les molécules de costimulation CD80 et CD81⁴⁷⁻⁴⁹. Parmi ces pDCs CD2⁺, une fraction exprime le CD56, notamment après stimulation et maturation par FLT3L^{50,51}. Ainsi, Wang et al. retrouvent une médiane de 4,5% de pDCs CD56⁺ sur 22 échantillons, avec une large étendue allant de 1,3 à 20% des pDCs dans la moelle osseuse⁵². Ces pDCs sont CD56⁺ CD2⁺ CD7⁻ CD38^{fort} CD303⁺, expriment plus faiblement les TLR7/9 que les autres pDCs et ont des capacités réduites de sécrétion d'IFN-I. De plus,

elles partagent des caractéristiques avec les cDCs, notamment une capacité de production d'IL-12 après activation du TLR4 et une capacité d'activation des LT, laissant penser qu'il pourrait s'agir de précurseurs de cDCs, des pré-cDCs^{53,54}.

D'autre part, les pDCs ont des capacités de migration liées aux chimiokines environnantes, avec des localisations périphériques très diverses. Elles se différencient dans la moelle osseuse (MO), puis passent dans la circulation sanguine, où elles représentent moins de 1% des leucocytes^{52,55,56}. La voie sanguine est considérée comme transitoire pour l'accès aux organes lymphoïdes secondaires (ganglions, amygdales, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) et au thymus, en fonction des récepteurs à chimiokines exprimés, notamment CXCR4, CCR2, CCR5 et CCR7⁵⁷ (Figure 5).

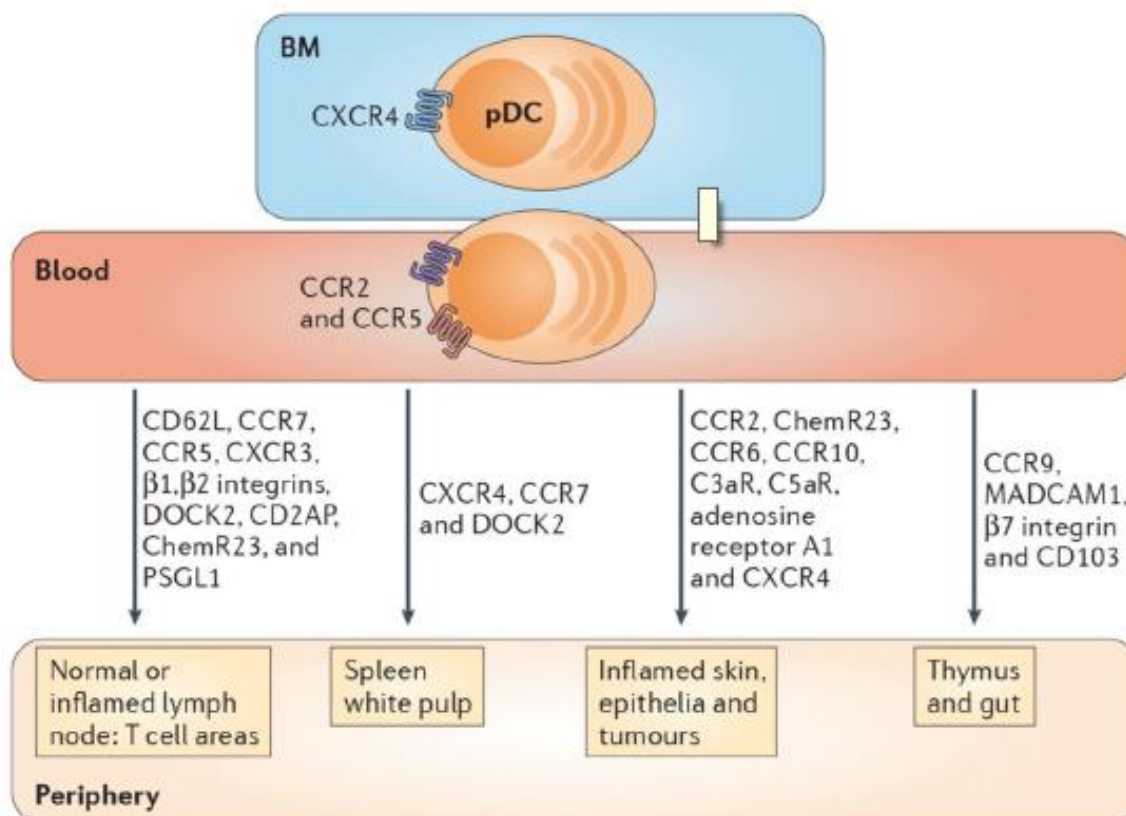


Figure 5 : Facteurs influençant la migration des pDCs d'après Swiecki and Colonna, 2015, Nat Rev Immunol²²

Les pDCs expriment des récepteurs à chimiokines (CXCR4, CCR2, CCR5) permettant leur recrutement en conditions physiologiques et inflammatoires. CXCR4 permet la rétention médullaire des pDCs tandis que CCR2 et CCR5 entraînent une mobilisation des pDCs dans la circulation sanguine. L'expression de diverses chimiokines et de leurs récepteurs entraîne une migration vers les tissus lymphoïdes secondaires tels que les zones T des ganglions normaux ou inflammés, la pulpe blanche de la rate, les epithelia, les tumeurs et les tissus cutanés inflammés, ou encore le thymus et les amygdales.

2.2. Stades de maturation des pDCs médullaires

En 2008, Martín-Martín *et al.*, de l'équipe espagnole d'Alberto Orfao apportent des données supplémentaires concernant la maturation des précurseurs des pDCs, les pré-pDCs médullaires, du point de vue phénotypique et propose de distinguer trois stades de maturation progressive : le stade I immature ($CD34^{++}HLA-DR^{++}/+++CD123^{++}/+++CD45^{+}/++$), le stade II intermédiaire ($CD34^{+}HLA-DR^{+}/++CD123^{++}/+++CD45^{+}/++$) et le stade III mature correspondant aux pDCs ($CD34^{+}HLA-DR^{++}CD123^{++}/+++CD45^{++}$)⁴⁶. Les marqueurs précoces de différenciation lymphoïde (CD22, CD99), myéloïde (CD33, CD13) et monocyttaire (CD64) sont exprimés uniquement au stade I, associés au CD86 (Figure 6).

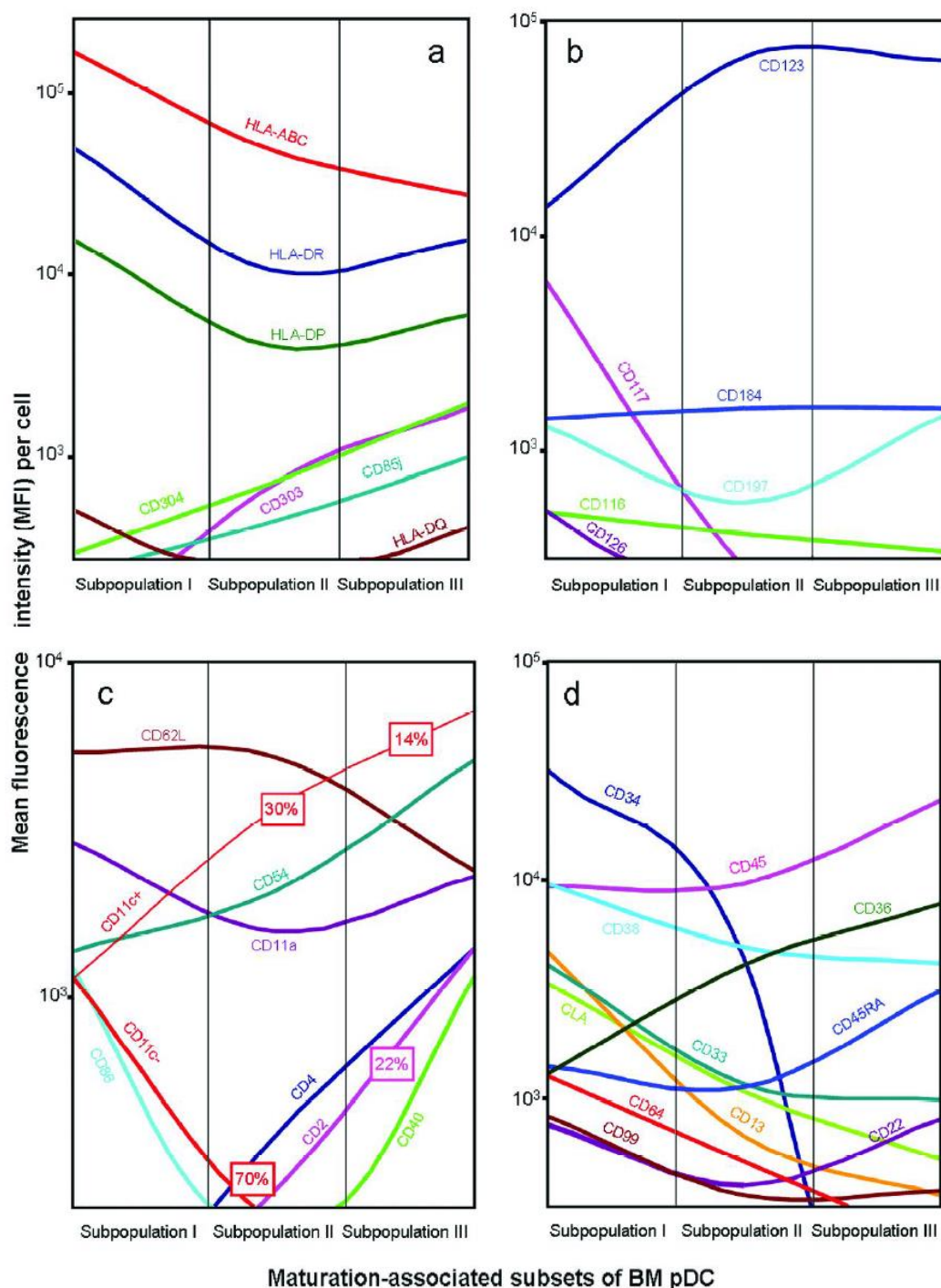


Figure 6 : Evolution d'expression de différents marqueurs au cours du développement médullaire des pré-pDCs, d'après Martín-Martín *et al.*, 2009⁴⁶

Marqueurs regroupés par panels : a = marqueurs DCs et molécules de présentation de l'antigène ; b = récepteurs à cytokines et chimiokines ; c = molécules d'adhésion et de costimulation ; d = autres molécules, dont les marqueurs lymphoïdes (CD22, CD99), myéloïdes (CD33, CD13) ou monocytaires (CD64).

Les marqueurs plus spécifiques de lignée que sont CD303, CD304 et CD4 commencent à apparaître dès ce stade I de maturation, avec une augmentation d'expression progressive jusqu'au stade III (Figure 7).

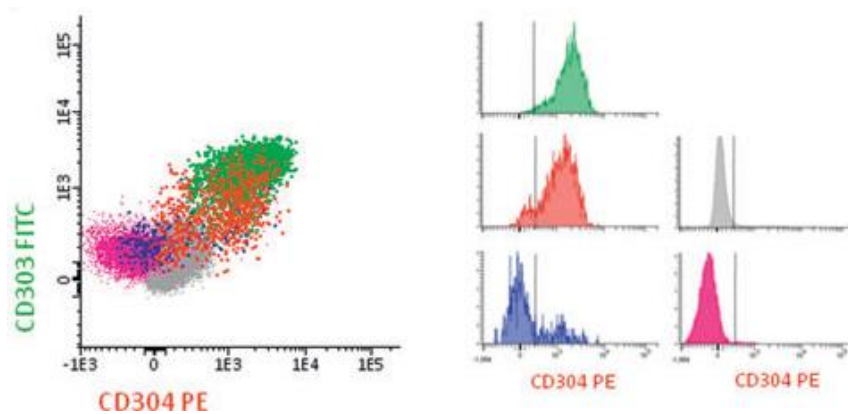


Figure 7 : Expression du CD304 et du CD303 en cours de maturation des pré-pDCs d'après Martin-Martin *et al.*, 2009⁴⁶

L'expression des CD304 et CD303 est croissante en cours de maturation, du stade I immature (CD34⁺⁺/HLA-DR⁺⁺/+++ /CD123⁺⁺/CD45^{+/++}) en bleu au stade II intermédiaire (CD34⁺/HLA-DR^{+/++}/CD123⁺⁺/+++ /CD45^{+/++}) en orange et au stade III mature (CD34⁻/HLA-DR⁺⁺/CD123⁺⁺/+++ /CD45⁺⁺) en vert. Les CD34⁺ HPCs sont en fuchsia et les non pré-pDCs en gris.

Il est à noter que seul le stade III montre des capacités de sécrétion d'IFN, tandis que l'activité endocytaire est réduite par rapport au stade I. Si ces travaux ont rattaché les différences phénotypiques et fonctionnelles des pDCs à différents stades de maturation normale, ils sont antérieurs aux nouvelles classifications proposées dans lesquelles cette hétérogénéité au sein des pDCs s'explique aussi par l'existence de sous-types cellulaires différents, comme détaillé ci-après avec les DCs AXL⁺ SIGLEC6⁺ ⁵⁸. Ainsi, ce modèle de maturation devrait être remis en perspective et actualisé en tenant compte de ces nouvelles descriptions.

3. Différenciation et programme transcriptionnel des pDCs

3.1. Programme transcriptionnel

Les premiers facteurs de croissance nécessaires à la génération de pDCs à avoir été mis en évidence sont communs avec les lignées granuleuses et macrophagiques : notamment CSF-1 et GM-CSF. Les pDCs expriment le récepteur FLT3, dont le ligand FLT3L entraîne à lui seul la différenciation en pDCs^{59,60}, à partir de progéniteurs myéloïdes communs, puis progressivement macrophagiques et dendritiques (Figure 8). La nécessité d'un seul facteur pour générer des pDCs suggère un programme transcriptionnel robuste impliquant notamment TCF4^{61,62}. Le facteur de transcription TCF4 (E2-2) est également important dans l'ontogénie lymphoïde et joue un rôle pivot dans la différenciation et le développement des pDCs, conjointement avec BCL11A et MTG16^{61,63-65}.

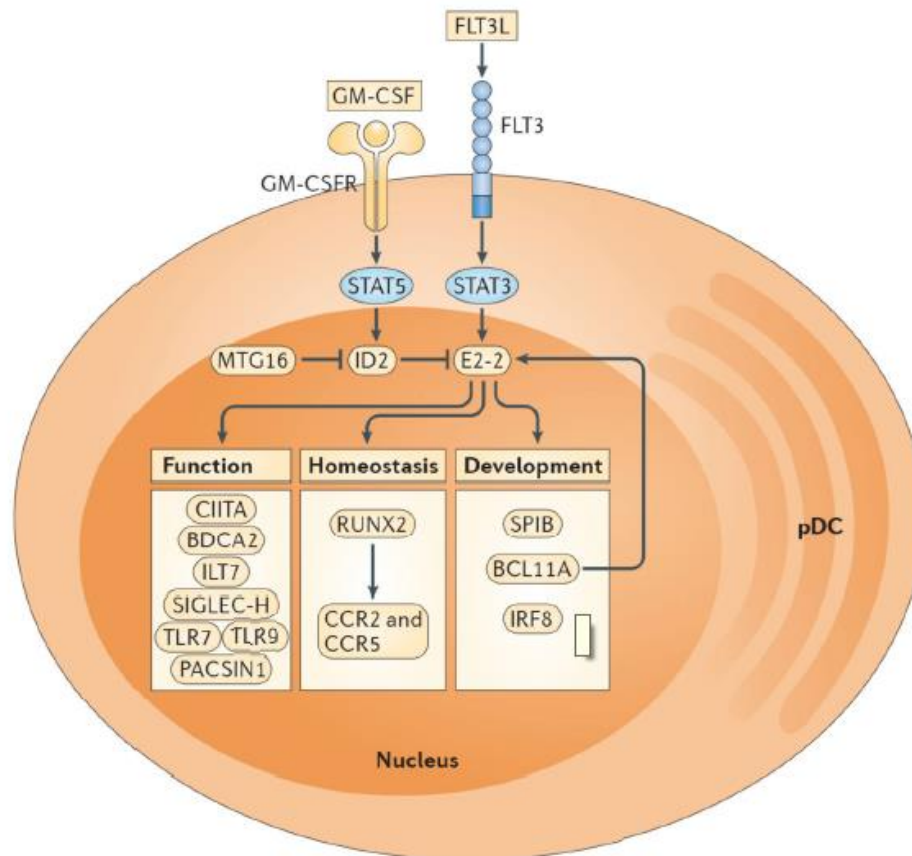


Figure 8 : Développement et différenciation des pDCs d'après Swiecki and Colonna, 2015²²

La différenciation pDC dépend étroitement de la voie de signalisation FLT3L-FLT3-STAT3-TCF4(E2-2). Inversement, l'activation de la voie de signalisation GM-CSF-STAT5 induit l'expression d'ID2, un inhibiteur du programme transcriptionnel dépendant de TCF4, tandis que le cofacteur transcriptionnel MTG16 promeut la différenciation pDC en inhibant l'inhibiteur ID2. En aval, SPIB, BCL11A et IRF8 sont nécessaires au développement des pDCs, tout comme RUNX2 impliqué dans la survie, l'homéostasie et la mobilisation des pDCs via l'expression de CCR2 et CCR5. Les fonctions clés des pDCs sont assurées par quelques marqueurs membranaires clés, CIITA transactivatrice du CMH de classe II, BDCA2, ILT7, SIGLEC-H régulatrices de la production d'IFN-I et les TLR7/9 permettant la reconnaissance d'acides nucléiques exogènes.

Le programme transcriptionnel menant aux pDCs fait également intervenir d'autres facteurs de transcription⁴⁵. ETV6 réfrène la signature cDC au profit de la signature pDC, tandis qu'IRF8 est indispensable aux pDCs et dans une moindre mesure aux cDCs, tout comme IKZF1⁶⁶, ZEB2⁴⁵ et SPIB⁶⁷. La rétention des pDCs immatures dans la moelle est sous le contrôle de SPIB, qui favorise l'activité de TCF4⁶⁴. Après différenciation, RUNX2 facilite la libération des pDCs matures de la moelle et les facteurs de transcription de la famille des IRF assurent les capacités de synthèse exceptionnelles en IFN-I des pDCs, notamment IRF8^{68,69}, IRF7, IRF5 et IRF4⁴⁵. La production d'IFN-I régulée par IRF7 est réprimée par MYC et favorisée par RUNX2.

3.2. Une origine myéloïde ou lymphoïde des pDCs

Comme déjà précisé, les DCs sont caractérisées par leur grande plasticité et la diversité de leurs localisations et de leurs fonctions. La distinction entre cDCs et pDCs intervient tardivement dans le programme transcriptionnel des lignées dendritiques, avec un modif commun PU.1 et IRF8. ID2 engage vers les cDC1, et inhibe TCF4, qui est pour sa part un facteur de transcription engageant vers les pDCs (Figure 9).

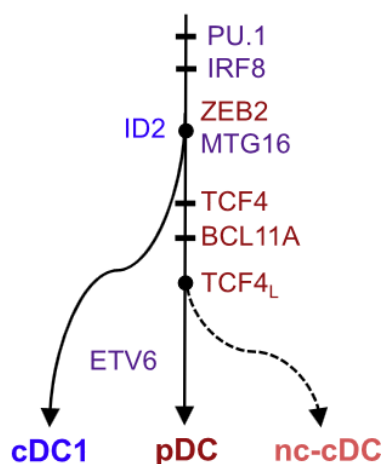


Figure 9 : Contrôle transcriptionnel de la différenciation entre pDCs et cDCs, d'après Reizis *et al.*, 2019⁶⁰

Facteurs de transcription régulation la différenciation médullaire des DCs. Les facteurs de transcription communs aux pDCs et cDCs sont représentés en violet, ceux enrichis dans les cDCs sont en bleu, et ceux enrichis dans les pDCs sont en rouge. nc-cDC : cDCs non canoniques; TCF4L : isoforme longue de TCF4, spécifique des pDCs.

Cette proximité et cette plasticité des pDCs et des cDCs se manifeste par la possibilité des pDCs à se différencier en cDCs⁷⁰, notamment après introduction d'IL-3 et de CD40L¹⁹. Dans ce modèle, les pDCs sont alors considérées comme des pré-DCs¹⁹. Cependant, contrairement aux cDCs, les pDCs ne seraient pas limitées à une origine myéloïde passant par le CDP, mais pourraient aussi provenir d'une branche lymphoïde⁹. La branche myéloïde comprendrait les CMP, MDP et CDP avec un potentiel à la fois de cDC et de pDC^{71,72}. Cette voie de différenciation macrophagique et dendritique est hautement conservée chez les mammifères, démontrant l'importance de ces lignées dans le système immunitaire.

Des données récentes plaident en revanche pour une branche lymphoïde impliquant le CLP⁷³⁻⁷⁷. Chez la souris, il a ainsi été montré que les pDCs se développent majoritairement à partir des progéniteurs lymphoïdes IL-7R⁺ avec expression de SiglecH et Ly6D définissant l'engagement vers la lignées pDC, sous la dépendance du facteur de transcription IRF8^{74,75}. Un progéniteur similaire a aussi été décrit chez l'Homme⁷⁸. De plus, les pDCs murines d'origine lymphoïde présentent des stigmates d'engagement lymphoïde, tels que l'expression de RAG1 et des réarrangements D-J au niveau des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines⁷⁷. A noter que cette hétérogénéité lymphoïde et myéloïde ne permettrait pas d'obtenir un pool homogène de pDCs, leur potentiel sécrétoire en IFN-I étant similaire, mais les capacités de présentation antigénique des pDCs myéloïdes seraient identiques aux cDCs et réduites pour les pDCs lymphoïdes⁷⁵. Une hypothèse pour cette hétérogénéité est que les pDCs « myéloïdes » correspondraient en fait à un pool de cellules contaminées par des pré-cDCs⁷⁴. Dans cette théorie, les pDCs murines seraient uniquement d'origine lymphoïde, rejoignant *in fine* les distinctions originelles des pDCs/mDCs. Dans ce modèle lymphoïde, les pDCs présentent des caractéristiques similaires cellules lymphoïdes innées (ILC pour Innate Lymphoid Cells). En effet, les

ILCs sont des effecteurs tissulaires dérivés d'un CLP exprimant la sous-unité α du récepteur de l'IL-7 (CD127), le proto-oncogène c-Kit (CD117) et FLT3⁷⁹. Ces ILCs, à la différence des lymphocytes B et T, n'expriment pas de récepteur à l'Ag et se répartissent en ILC cytotoxiques (NK) et en ILC auxiliaires (ILC1, ILC2, ILC3) en miroir des LT. Dress *et al.* proposent ainsi un modèle de différenciation chez la souris, où les pDCs correspondraient à des ILCs plasmocytoïdes (pILCs), dépendantes du FLT3L, productrices naturelles d'IFN-I, avec des capacités réduites de présentation de l'Ag car non issues d'un MDP (Figure 10)⁷⁴.

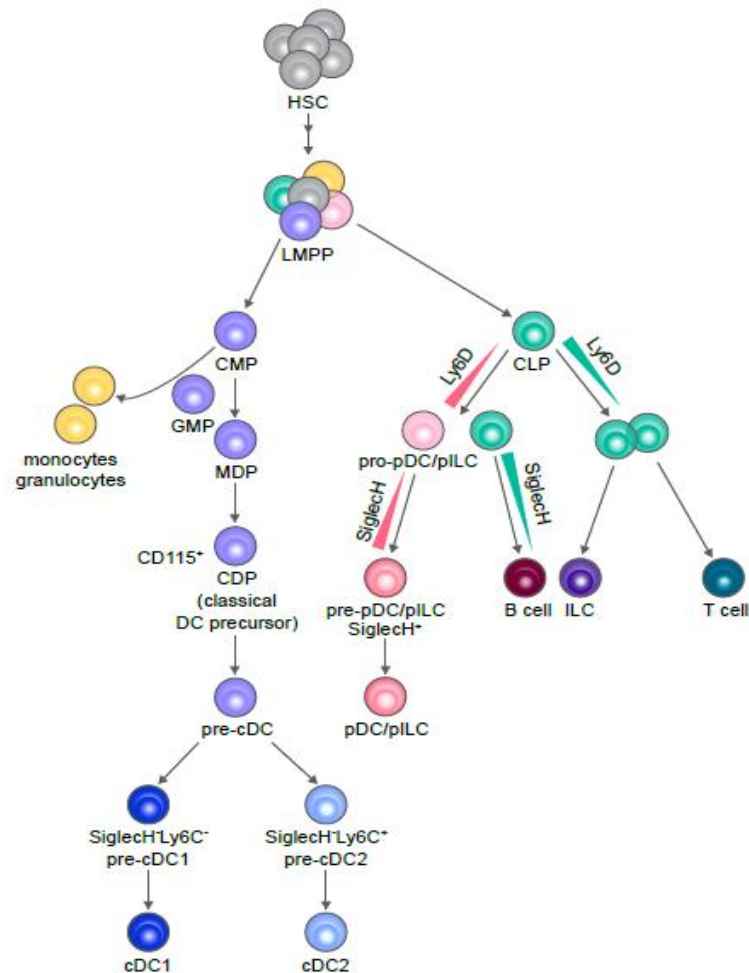


Figure 10 : Modèle murin d'ontogénie des DCs d'après Dress *et al.*, 2019 (Suppl Fig7)⁷⁴

Modèle rapprochant les pDCs des ILCs. Ce modèle a été proposé chez la souris et n'est que potentiellement transposable chez l'Homme avec SIGLEC6 humain correspondant à SiglecH murin.

3.3. Place des pDCs thymique dans l'hématopoïèse

Enfin, il a été montré que les pDCs thymiques ne sont pas issues de pDCs matures provenant de la circulation sanguine, mais de progéniteurs intrathymiques JAG1⁺ ayant mûri dans le thymus⁸⁰. Les récentes données de Lavaert *et al.* montrent que le thymus humain est colonisé par des progéniteurs issus de la MO donnant naissance à deux contingents de précurseurs, un contingent engagé dans la lignée T et un autre capable de générer des LT mais aussi des pDCs⁸¹. Ce mécanisme d'ontogénèse des pDCs thymiques n'est pas intégré dans les modèles présentés ci-dessus, car les pDCs ne dérivent alors ni d'un CDP, ni d'un CLP proche des progéniteurs B, mais plus probablement d'un précurseur T précoce (ETP pour Early T-cell Precursor), c'est-à-dire d'un progéniteur issu de la MO ayant conservé ses potentiels de différenciation multilignée, lymphoïde et myéloïde.

D. Les cellules dendritiques AXL⁺ SIGLEC6⁺

1. Première description

En 2017, une sous-population non encore caractérisée de DCs a été décrite par Villani *et al.* par séquençage ARN haut débit de cellules uniques (*single cell RNA-seq*). Au sein des DCs CD123^{fort} HLA-DR^{fort}, on distingue les pDCs classiques, dites canoniques correspondant au cluster DC6 et un nouveau sous-groupe, le cluster DC5 dans lequel on retrouve des DCs AXL⁺ SIGLEC6⁺ CD11c^{low}, renommées AS-DCs (Figure 11)⁵⁸. Ces AS-DCs partagent des signatures enrichies de type pDC et cDC. De plus, elles sont caractérisées par une faible sécrétion d'IFN-I et sont capables de stimuler la prolifération des LT comme des cDCs.

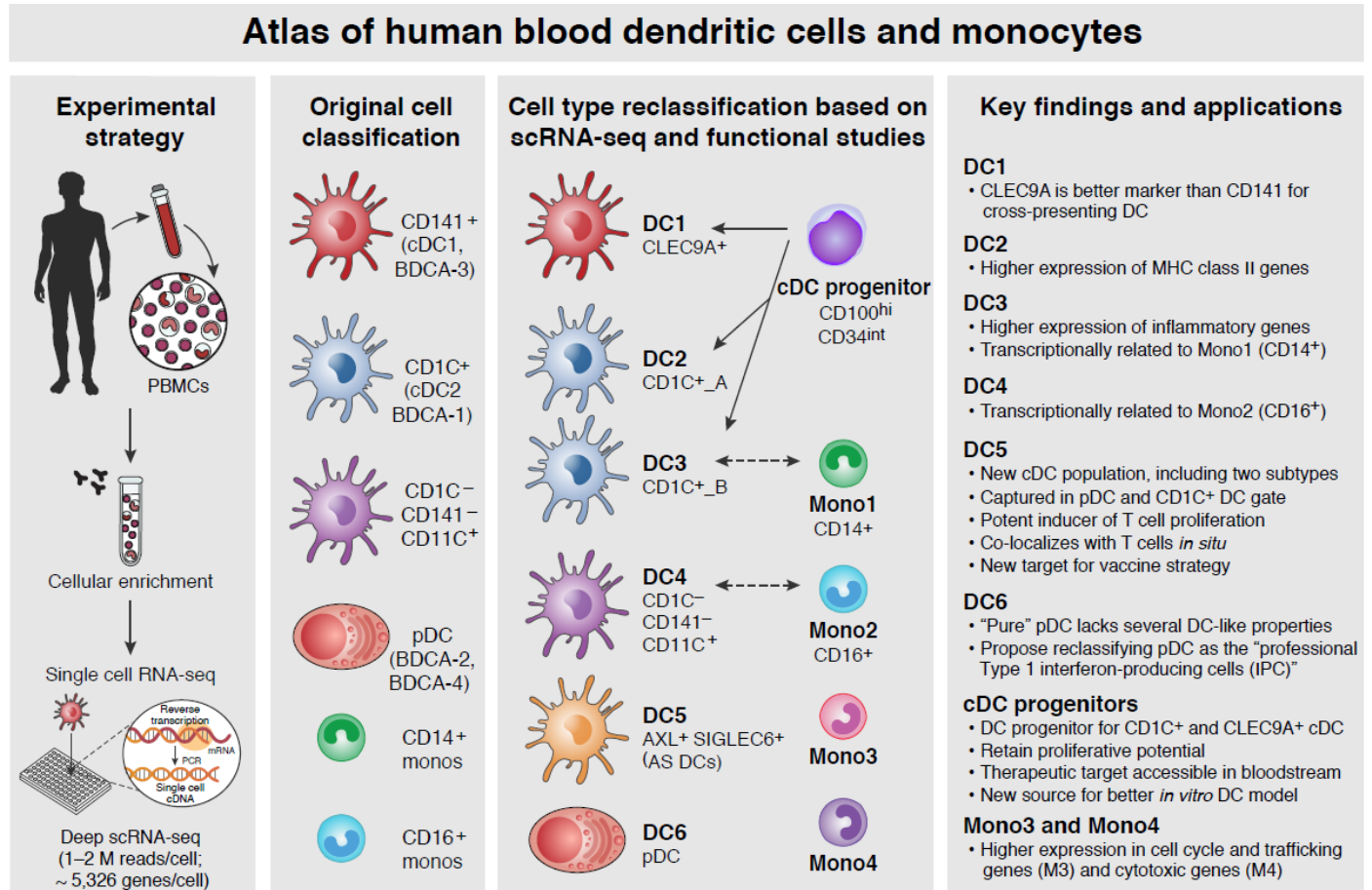


Figure 11 : Populations monocytaires et dendritiques décrites par Villani *et al.*, 2017⁵⁸

L'étude sc-RNAseq confirme les sous-types de DCs déjà connus (DC1 = cDC1 CD141⁺ ; DC4 = cDCs CD11c⁺), mais distingue de nouveaux : les cDC2 CD1c⁺ correspondent à 2 clusters : DC2 et DC3 ; les pDCs correspondent au cluster DC6 (pDCs canoniques) et DC5 (AS-DCs). PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells* ; scRNA-seq, *single-cell RNA-sequencing*, séquençage haut débit cellule unique du transcriptome (de l'ARN).

2. Marqueurs phénotypiques

Les AS-DCs expriment des marqueurs de cDCs tels que les CD2, CD33, CD5 et CD86 mais aussi des marqueurs de pDCs, comme le CD123 et le CD303⁵⁸. Ainsi, les AS-DCs correspondraient aux descriptions antérieures de pDCs CD2⁺ distinctes des pDCs CD2⁻, les pDCs canoniques⁴⁷. De plus, elles présentent certaines caractéristiques de lymphocytes B, avec un profil IGLL1⁺ SIGLEC1⁺ CD22⁺ LYZ⁺, CD81⁺^{49,58,63} (Figure 12).

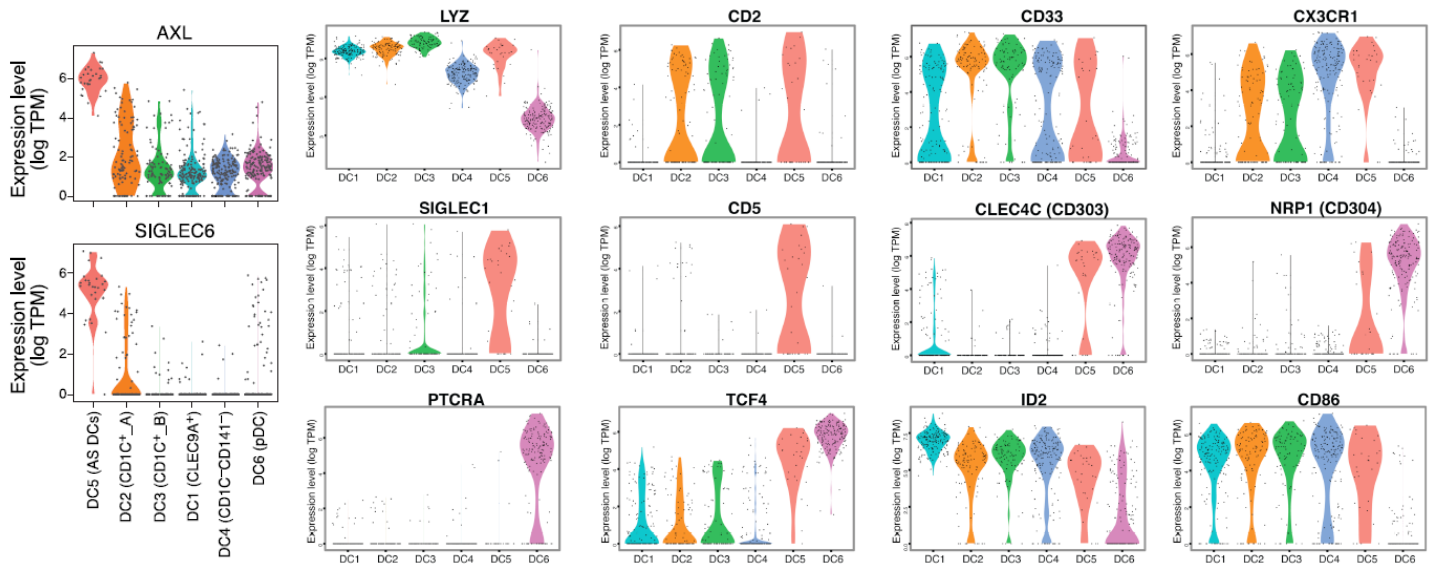


Figure 12 : Expression de marqueurs différentiels des AS-DCs dans les DCs humaines, adapté de Villani *et al.*, 2017⁵⁸

DC1 (bleu turquoise), cDC1 CD141⁺; DC2 (orange) et DC3 (vert), cDC2 CD1c⁺; DC4 (bleu roi), cDCs CD11c⁺, DC5 (rouge), AS-DCs; DC6 (violet), pDCs canoniques. Les AS-DCs expriment certains marqueurs absents des pDCs canoniques tels que AXL, SIGLEC6, SIGLEC1, CD2, CD5, CD33, CX3CR1, CD86, ID2, tandis que certains marqueurs « pDC » sont partagés : TCF4, CD303 notamment.

3. Place des AS-DCs par rapport aux cDCs et aux pDCs

Ces AS-DCs ne seraient capables de maturer qu'en cDCs CD11c⁺, et pas en pDCs canoniques. Cela expliquerait les publications décrivant des pDCs maturant en cDCs, puisqu'il ne s'agirait en fait pas de pDCs canoniques mais d'AS-DCs. Leurs propriétés à la fois de pDCs et de cDCs, expliquent certaines descriptions contradictoires sur les pDCs, car les descriptions de DCs CD123^{fort} HLA-DR^{fort} peuvent en fait correspondre aux pDCs canoniques ou aux AS-DCs^{58,82}, et la branche myéloïde des pDCs serait en fait contaminée par des pré-cDCs de type AS-DCs^{74,75}.

Cette étude a également permis de démembrer finement ces AS-DCs, car les cellules Lin⁻ HLA-DR^{fort} CD141⁻ CD14/CD16⁻ SIGLEC6⁺ AXL⁺ correspondant aux AS-DCs se répartissent en deux sous-populations, l'une d'elle est CD11c⁺ et plus proche des cDCs CD11c⁺, tandis que l'autre est CD123^{fort}, plus proche des pDCs (Figure 13).

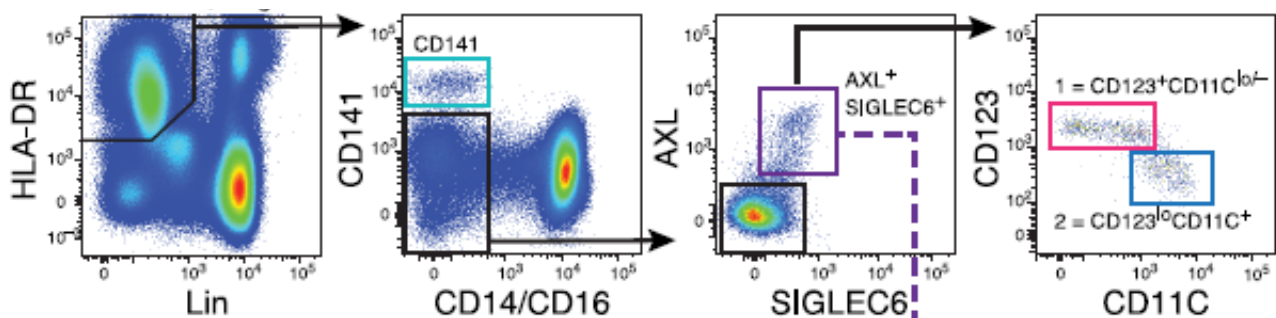


Figure 13 : Stratégie de sélection et hétérogénéité des AS-DCs d'après Villani *et al.*, 2017⁵⁸

Les AS-DCs sont HLA-DR^{fort} Lin⁻ CD14⁻/CD16⁻ AXL⁺ SIGLEC6⁺, et variables pour le CD123 et le CD11c avec des AS-DCs CD123⁺ CD11c^{-/faible} et d'autres AS-DCs CD123^{faible} CD11c⁺.

4. Une origine myéloïde ou lymphoïde incertaine

Dans l'étude de Villani *et al.*, les pDCs canoniques sont les seules pDCs productrices de grandes quantités d'IFN-I, c'est-à-dire, les IPCs connues de longues dates, ou les pILCs identifiées chez la souris⁷⁴. Les dénominations et origines des DCs CD123⁺ HLA-DR⁺ sont donc très complexes, mais cette complexité ne s'arrête pas là. En effet, le fait que ces AS-DCs soient des pré-cDCs n'assure pas qu'il s'agisse de DCs d'origine myéloïde. L'engagement dans la lignée pDC de précurseurs lymphoïdes est associé à l'expression de SiglecH chez la souris, l'équivalent murin de SIGLEC6⁷⁵. L'équivalent murin des AS-DCs pourrait donc être d'origine lymphoïde, c'est l'hypothèse de Dekker *et al.*, où elles sont issues de CLP avec un phénotype CD19⁺ AXL⁺ SIGLEC1⁺, et renommées B-pDC. Cette origine lymphoïde B des B-pDCs murines/AS-DCs humaines serait cohérente avec l'expression par les AS-DCs de marqueurs de lignée B tel que le CD22, de lignée T tel que le CD2 et CD5, les lectines Ig-like SIGLEC1 et SIGLEC6 et les marqueurs d'activation CD86 et CD81⁵⁰. Cependant, cette étude ne fournit aucune information quant aux capacités de ces B-pDCs à maturer en cDCs.

Qu'en est-il alors des pDCs canoniques ? Seraient-elles alors d'origine myéloïde, issues du CDP ? Cela signifierait alors que les pDCs canoniques (les IPCs) ne sont pas des pILCs d'origine lymphoïde, comme proposé par Dress *et al.*⁷⁴. Ces modèles sont donc contradictoires, et globalement, l'origine lymphoïde et/ou myéloïde des pDCs canoniques n'est à l'heure actuelle pas certaine.

En pratique, quelle que soit l'ontogénie lymphoïde ou myéloïde des AS-DCs et des pDCs canoniques, il est nécessaire de tenir compte de l'hétérogénéité du pool de pDCs, avec ces 2 populations distinctes, quelle que soit la dénomination donnée aux AS-DCs : CD2⁺ pDCs, B-pDCs ou pDCs non canoniques, comme défini par Reizis *et al.*⁶⁰.

E. Bilan des populations dendritiques chez l'Homme

Les études récentes menées notamment par sc-RNA-seq ont permis de distinguer des sous-types de DCs, qu'il s'agisse des cDC2, ou des pDCs/AS-DCs (Tableau 1).

Tableau 1 : Différents sous-types de cellules dendritiques chez l'Homme

Phénotype commun : Lin⁻ (CD3,CD19,CD20,CD14,CD64,CD56,GPA), CMH II^{fort} HLA-DR^{fort}

Dénominations	Cluster (Villani et al., 2017)	Localisation tissulaire	Origine	Profil phénotypique	Fonction connue
AS-DCs	DC5	Sang Amygdale	myéloïde et/ou lymphoïde	CD123+ (IL3RA) CD303+ (BDCA2+) AXL+ SIGLEC6+ SIGLEC1+ CD2+ CD1c+ ou CD1c-	pré-DC activation des LT présentation de l'Ag sécrétion faible d'IFN-I
pDCs non canoniques					
pDCs canoniques	DC6	Sang Amygdale Ganglions Moelle osseuse	lymphoïde et/ou myéloïde	CD123+ (IL3RA) CD303+ (BDCA2+) CD304+ (BDCA4+)	sécrétion massive d'IFN-I faibles capacités d'activation des LT
IPCs pILCs					
cDC1 CD141+	DC1		Myéloïde	CD11c+ CD141+ (BDCA-3) CLEC9A+	
cDC2 CD1c+	DC2	Sang	Myéloïde	CD11c+ CD1c+ (BDCA-1)_A FCGR2B/CD32B+	
cDC2 CD1c+	DC3	Rate Ganglion	Myéloïde	CD11c+ CD1c+ (BDCA-1)_B CD163+ CD36+ CD14+, S100A9+, S100A8+	
cDC CD16+	DC4		myéloïde	CD11c+ CD1c- CD141- FCGR3A/CD16+	
cDC CD1a+		Tissus non lymphoïdes	myéloïde	CD1a+ CD14-	
cDC CD14+			myéloïde	CD1a- CD14+	
cDC		Derme	myéloïde	CD141+ CLEC9A+ TLR3+ FLT3+++	
Cellules de Langerhans		Epiderme	embryonnaire	CD11c+ EpCAM+ Langérine+ CD1a+	

En conclusion de cette première partie concernant la physiologie des pDCs, les données actuelles permettent de distinguer les pDCs des AS-DCs, tant du point de vue phénotypique que fonctionnel (Tableau 1, Figure 14). Les AS-DCs présentent des caractéristiques partagées avec les pDCs canoniques mais aussi avec les cDCs, associé à un programme transcriptionnel intermédiaire. Si ces caractéristiques commencent à être bien décrites, l'origine myéloïde ou lymphoïde de ces deux sous-types reste en revanche encore incertaine (Figure 14). A présent, cette dichotomie pDCs canoniques/AS-DCs est à prendre en compte dans les études menées sur les DCs CD123⁺ HLA-DR⁺, et également dans le cadre des pathologies tumorales touchant apparemment les pDCs.

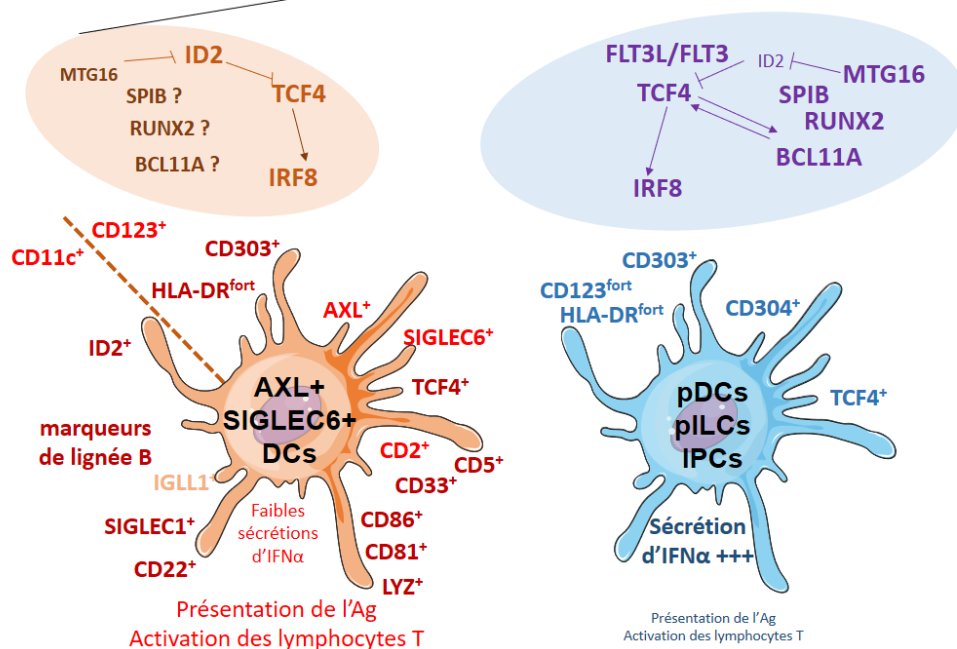
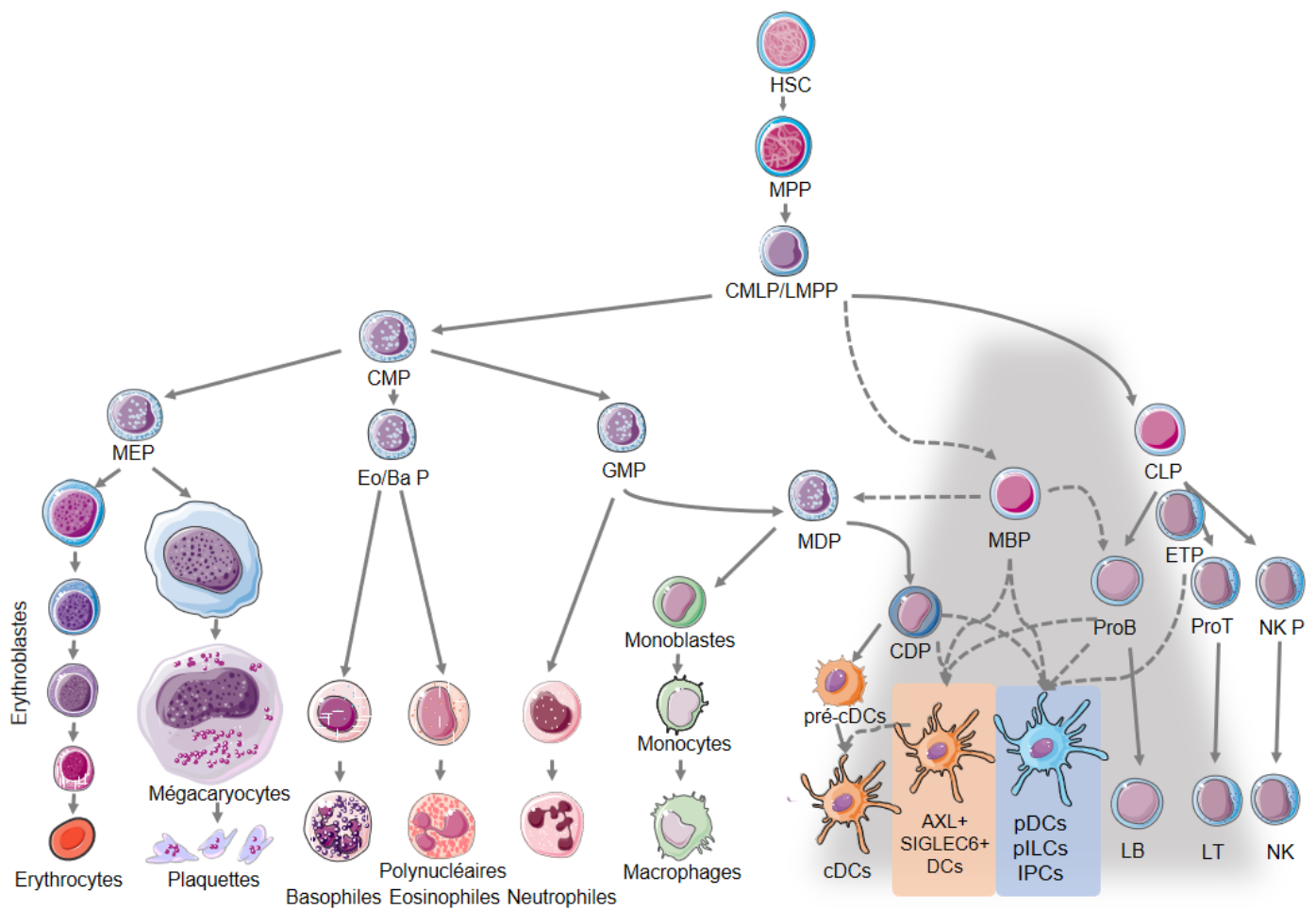


Figure 14 : Modèle de différenciation hématopoïétique intégrant les pDCs canoniques et les AS-DCs

Le panel du haut présente le modèle d'hématopoïèse avec une place incertaine pour les AS-DCs et les pDCs canoniques. Le panel du bas présente les réseaux transcriptionnels dérégulés dans ces deux sous-types puis en dessous les marqueurs phénotypiques caractéristiques, ainsi que les propriétés fonctionnelles de ces deux sous-types. CDP : Common Dendritic Progenitor; CLP, Common Lymphoid Progenitor; CMP, Common Myeloid Progenitor; Eo/BaP : Eosinophile/Basophile Progenitor; ETP : Early T-cell Precursor ; GMP : Granulocyte-Macrophage Progenitor; GMDP, Granulocyte-Macrophage Dendritic Progenitor; HSC, Haematopoietic stem cell; LMPP, Lymphoid primed MultiPotential Progenitor; MBP : Myeloid B-cell Progenitor ; MDP, Macrophage Dendritic Progenitor; MEP : Megakaryocyte-Erythroid Progenitor; MKE, megakaryocyte erythroid potential ; MLP : Multi-Lymphoid Progenitor ; MPP : Multipotent Progenitor.

II. Onco-hématologie

A. Classification actuelle des hémopathies

En hématologie, à chaque type cellulaire physiologique correspond un équivalent tumoral, une hémopathie. Ces hémopathies sont plus ou moins agressives et classées dans la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) selon la contrepartie physiologique correspondant à la cellule tumorale⁸³. Ainsi, on retrouve des hémopathies myéloïdes à prépondérance érythrocytaire, mégacaryocytaire, granuleuse ou monocyttaire, et des hémopathies lymphoïdes B et T. Schématiquement, on distingue des hémopathies myéloïdes/lymphoïdes et avec/sans blocage de maturation (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification simplifiée des hémopathies malignes

	Hémopathies myéloïdes	Hémopathies lymphoïdes
Hémopathies prolifératives sans blocage de maturation	Syndromes myéloprolifératifs (SMP) :	Lymphomes non hodgkiniens B
	Syndromes myélodysplasiques (SMD)	Myélome multiple
	SMP/SMD dont Leucémie MyéloMonocytaire Chronique (LMMC)	Lymphomes de Hodgkin
Hémopathies avec blocage de maturation		Lymphomes non hodgkiniens T ou NK
	Leucémies aiguës myéloblastiques (LAM)	Leucémies aiguës lymphoblastiques
	Hémopathies apparentées	B (LAL-B) T (LAL-T)

1. Leucémies aiguës myéloïdes et lymphoblastiques

Les leucémies aiguës (LA) sont des hémopathies malignes définies par la prolifération clonale de cellules hématopoïétiques immatures bloquées dans leur différenciation, appelées blastes. Les LA se caractérisent par des signes d'insuffisance médullaire, conséquences de l'envahissement par les blastes. Cet envahissement inhibe l'hématopoïèse physiologique entraînant une anémie avec asthénie, pâleur et essoufflements, une thrombopénie à risque hémorragique accru, et une neutropénie avec une susceptibilité accrue aux infections bactériennes. On distingue les LA myéloïdes (LAM) dans lesquelles la cellule hématopoïétique immature est de lignée myéloïde, des LA lymphoblastiques (LAL-B ou T) dans lesquelles la cellule tumorale est de lignée lymphoïde B ou T.

Les LAM surviennent davantage chez l'adulte de plus de 60 ans, l'âge médian étant de 71 ans en France, avec une incidence qui augmente avec l'âge, lentement avant 60 ans, puis plus rapidement ensuite. En France, environ 2 800 diagnostics de LAM sont posés chaque année, avec une incidence mondiale estimée à 2,3-2,6 pour 100 000 personnes par an, et un taux d'incidence supérieur chez le sujet âgé, notamment de sexe masculin⁸⁴.

Les LAL sont des hémopathies touchant principalement l'enfant, mais pouvant survenir à tout âge. L'âge médian chez l'homme est de 17 ans, chez la femme de 22 ans, avec une légère prédominance masculine (sex ratio M/F=1,6). Globalement, l'incidence en France était de 810 diagnostics en 2012, avec une incidence mondiale estimée à 1,9 cas pour 100 000 personnes par an⁸⁴.

2. Lymphomes Non Hodgkiniens

Les lymphomes sont définis par la prolifération de LT, NK ou LB tumoraux. Ils se caractérisent le plus fréquemment par une hypertrophie des organes lymphoïdes secondaires avec des polyadénopathies, mais d'autres localisations sont possibles, notamment spléniques, gastro-intestinales ou cutanées, au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Ces lymphomes ont une propension plus ou moins marquée à envahir la MO et la circulation sanguine, avec des entités presque systématiquement circulantes, telle que la leucémie lymphoïde chronique, et d'autres plus rarement leucémisées telle que les lymphomes B diffus à grandes cellules. On distingue d'une part le lymphome de Hodgkin et d'autre part les lymphomes non hodgkiniens (LNH), B ou T/NK. Les LNH-B sont très majoritaire et correspondent à une multitude d'entités qui ne seront pas détaillée ici. *A contrario*, les LNH-T ou NK sont rares en France. On estime qu'environ 1400 nouveaux cas de LNH-T/NK sont diagnostiqués chaque année, essentiellement chez l'adulte, avec une médiane d'âge de 66-67 ans. Il s'agit en fait d'une quinzaine d'entités différentes, mais avec certaines caractéristiques communes : plus de 60% des cas correspondent à des lymphomes T périphériques et 30% des cas présentent une atteinte cutanée⁸⁴.

3. Hémopathies à pDCs

Des hémopathies ayant une contrepartie physiologique de lignée dendritique ont été décrites, avec d'une part les histiocytoses dont les cellules d'origine sont dérivées soit des cDCs (maladie d'Erdheim-Chester, xanthogranulome juvénile), soit des LCs (histiocytoses langerhansiennes) et d'autre part les hémopathies à pDCs⁸³. Les histiocytoses ne seront pas abordées ici.

Du fait des difficultés d'identification et de classification des pDCs physiologiques, les contreparties tumorales des pDCs ont été décrites tardivement. A la fin des années 90, des cellules d'aspect blastique CD4⁺ CD56⁺ ont été rapportées dans le cadre d'hémopathies à localisations cutanées sous les dénominations de lymphomes/leucémies agranulaires NK/T car exprimant le CD56 comme les lymphocytes NK et le CD4 comme les LT CD4⁺⁸⁵⁻⁸⁸. Cette dénomination paraissait tout à fait cohérente avec les présentations classiques des LNH T. En 2001, Chaperot *et al.* ont rattaché ces hématodermies exprimant les CD4, CD123, HLA-DR à la lignée pDC⁸⁹. En effet, cette étude a montré que les blastes sont capables de maturer en DCs capables de présenter l'Ag et de sécréter de l'IFN-I, après stimulation par IL-3 et CD40L⁸⁹. Les blastes expriment également les mêmes récepteurs à chimiokines que les pDCs physiologiques (CXCR3, CXCR4, CCR7, CCR6)⁹⁰. Ainsi, la dénomination recommandée actuellement pour cette entité est *Blastic pDC neoplasm* (BPDCN), traduite généralement par leucémie dérivée de pDCs (LPDC), ou néoplasie à pDCs.

Cependant, malgré ces descriptions du début des années 2000, la place des LPDC dans la classification OMS n'a été clarifiée que récemment. La version 2008 de la classification OMS rattachait ces néoplasies aux LAM (section *Acute myeloid leukemia (AML) and related precursor*), du fait d'une évolution aiguë, et de l'origine supposée myéloïde ou lymphoïde, les LPDC ont été reclassées indépendamment (Tableau 3). Enfin, l'expression du CD56 dans les LPDC suscite encore débat, car seule une fraction très minoritaire des pDCs physiologiques exprime ce marqueur. Certaines équipes ont ainsi proposé que la cellule d'origine des LPDC est en fait restreinte à ces pDCs CD56⁺, ou à des pré-cDCs^{53,54}.

Tableau 3 : Classification OMS des hémopathies, adapté de Arber *et al.*, 2016⁹¹

Classification OMS des tumeurs hématopoïétiques et des tissus lymphoïdes
Myeloproliferative neoplasms (MPN)
...
Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN)
Myelodysplastic syndromes (MDS)
Myeloid neoplasms with germline predisposition
Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms
...
Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm
Acute leukemias of ambiguous lineage
Precursor lymphoid neoplasms
Mature B-cell neoplasms
Mature T- and NK-cell neoplasms
...
Histiocytic and dendritic cell neoplasms

B. Leucémies dérivées de pDC : les néoplasies à pDCs blastiques

1. Epidémiologie

Les LPDC sont des hémopathies rares et agressives à tropisme cutané, rechutant quasi-systématiquement avec résistance secondaire à la chimiothérapie^{88,89,92,93}. Elles représentent moins de 1% de l'ensemble des hémopathies malignes, avec une incidence inférieure à 0,05 cas pour 100 000 habitants⁹⁴⁻⁹⁶. En France, une trentaine de patients sont diagnostiqués chaque année, ce qui est cohérent avec une telle estimation^{97,98}. Jusqu'à récemment, les publications ne s'étaient concentrées que sur des cohortes réduites, mais on peut noter un effort ces dernières années pour mener des études épidémiologiques d'ampleur, notamment aux Etats-Unis, où Guru Murthy *et al.* se sont intéressés à un registre de 219 patients à la recherche de facteurs épidémiologiques pertinents⁹⁵, tandis que Ramachandran *et al.* ont extrait 932 cas entre 1973 et 2016 afin d'étudier les potentielles hémopathies secondaires à une LPDC⁹⁹. Il s'agit d'une pathologie à prédominance masculine avec un sexe ratio homme/femme compris entre 2 et 4/1^{98,100,101} selon les études, survenant chez le sujet âgé avec un âge médian au diagnostic de 60-70 ans^{94-96,98,100}. Cependant, de manière similaire aux lymphomes, il existerait en fait une répartition bimodale avec deux pics d'incidence : un avant 20 ans et un après 60 ans^{95,102-107}. Ainsi, une LPDC peut survenir à tout âge : de 11 à 89 ans dans notre cohorte⁹⁸. Aucune prédisposition génétique ou d'ordre ethnique n'a été démontrée. En effet, Guru Murthy *et al.* ont mené la seule étude ethnique jusqu'à présent, et même s'il suggèrent une incidence plus faible chez les non-Caucasiens non-Afro-Américains (n=14) par rapport aux Caucasiens (n=178), ce groupe est très hétérogène car il regroupe à la fois des patients Amérindiens, Asiatiques et Océaniens⁹⁵. Cette incidence suggérée plus faible n'est pas en cohérence avec les séries de cas publiées jusqu'à présent, car elle concernent certes des pays d'Europe et d'Amérique du Nord, mais aussi avec une forte dynamique des pays Asiatiques (Japon, Corée du Sud, Chine)^{14,95,98,100,103,108-110}. De plus, ces regroupements ethniques dans cette étude sont contestables également en ce qui concerne les Caucasiens, car ils intègrent probablement les hispaniques sud-américains, pourtant d'origine métissée caucaso-amérindienne.

2. Présentation clinique

Les premières manifestations sont cutanées dans 90% des cas¹⁰⁰, à type de lésions diverses, maculo-nodulaires ou xanthomateuses violacées, uniques, diffuses ou disséminées. Ces lésions vont progressivement s'étendre, en particulier sur le torse, avec un aspect ecchymotique ou nécrotique quelle que la présentation initiale corresponde à une lésion isolée ou disséminée^{98,100,111-114}. Cette évolution est inexorable, avec une atteinte médullaire et sanguine soit d'emblée, soit secondaire, faisant alors évoquer un LA, avec cytopénies (thrombopénie dans 75% des cas), asthénie et fièvre^{97,114,115}. Dans les cas non leucémisés d'emblée, l'évolution naturelle de la maladie en absence de traitement conduit systématiquement à un envahissement médullaire en quelques semaines ou quelques mois. L'espérance de vie à ce stade est alors de moins d'un an⁹⁸. L'atteinte du système nerveux central (SNC) est également possible, notamment à la rechute^{98,115-117}. Les lymphadénopathies sont fréquentes (40% des cas), et globalement tous les organes peuvent être envahis, notamment foie, rate, poumons, tractus digestif et sinus^{98,111,114,115}. La tomographie par émission de positons (TEP) serait utile afin d'évaluer l'envahissement au diagnostic, puis la réponse au traitement^{115,118}.

Le pronostic des LPDC est sombre, car après une très bonne réponse aux traitements de première ligne, classiquement une chimiothérapie intensive, les rechutes sont presque inévitables avec généralement une phase leucémique fulminante^{115,119}. La survie globale médiane est ainsi inférieure à un ou deux ans dans toutes les cohortes publiées, à l'exception des patients ayant bénéficié d'une allogreffe de CSH à la première rémission complète^{95,98,115,120-128}. L'échappement au contrôle du système immunitaire pourrait être impliquée dans les rechutes, d'autant que les cellules tumorales sont des CPA, physiologiquement capables d'induire une tolérance immunologique¹²⁹. Notamment, les pDC expriment des gènes immunorégulateurs, tels que les ligands de points de contrôle immunitaire (checkpoints immunitaires), l'IDO, l'arginase et le TFGβ¹³⁰. Les pDCs tumorales induiraient un épuisement des LT avec expression de récepteurs inhibiteurs (PD-1, TIGIT, CD160, TIM-3, LAG-3), une diminution de la prolifération et de la production de cytokines, une altération de la cytotoxicité et de l'apoptose.

La stratification pronostique des LPDC reste un enjeu du fait de la rareté de cette hémopathie et des difficultés diagnostiques. Des efforts conséquents ont toutefois été portés depuis quelques années sur des cohortes plus larges, et certains facteurs de pronostic péjoratif ont été proposés, notamment sur le plan clinique avec un âge avancé^{98,124,131,132}, une altération de l'état général évaluée par le statut ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group)^{98,124} ou des atteintes disséminées¹²⁴ qui impactent la survie. Sur le plan biologique, les facteurs de pronostic défavorable proposés sont les suivants : des LDH élevées¹³¹, une myélémie⁹⁸, une absence d'expression de la TdT^{131,132}, les mutations impliquant *ETV6*, *TP53* ou *NRAS/KRAS*¹³³, les délétions bialléliques 9p21.3^{134,135}, les délétions de *NR3C1*¹³⁶ un caryotype anormal ou des anomalies nombreuses détectées^{98,132}, et enfin les réarrangements de *MYC*^{108,110}. A l'heure actuelle, il est impossible d'intégrer l'ensemble de ces facteurs dans un score stratifiant les patients, car les facteurs proposés sont très divers, parfois non confirmés en analyse multivariée, d'où la nécessité d'être confirmés pour la plupart d'entre eux.

3. Diagnostic histologique et biologique

Le diagnostic de LPDC repose sur l'identification de marqueurs de la lignée pDC sur des blastes infiltrant les tissus. Les atteintes étant principalement cutanées et médullaires, les biopsies cutanées et ostéomédullaires sont les prélèvements généralement contributifs en anatomopathologie, ainsi que les échantillons médullaires et sanguins en cytométrie en flux (CMF).

3.1. Examens anatomopathologiques

L'infiltrat cutané se caractérise par une atteinte dermique superficielle, diffuse ou nodulaire, épargnant l'épiderme^{100,137,138}. La morphologie est très variable, la population cellulaire étant monotone, soit de grande taille avec un noyau rond à chromatine fine et des nucléoles proéminents pour les aspects immunoblastoïdes, soit de taille plus réduite avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, une chromatine plus condensée, des nucléoles plus petits et des vésicules pour les aspects lymphoïdes¹³⁹. Des corps apoptotiques et des images de mitoses peuvent également être rencontrés et signent le caractère prolifératif de la pathologie.

3.2. Examens cytologiques

En cytologie médullaire ou sanguine, la morphologie est mieux discernable mais très hétérogène. Les cellules blastiques sont généralement de taille moyenne, au cytoplasme légèrement basophile d'aspect irrégulier « granité » et agranulaire le plus souvent avec un noyau excentré aux contours parfois irréguliers et à la chromatine fine d'aspect blastique¹⁴⁰. On note des projections cytoplasmiques, des pseudopodes dits de mains en miroir, qui sont plus évocatrices d'une morphologie plasmocytoïde. Egalement, la plupart des cas présentent des microvacuoles alignées sous la membrane cytoplasmique, dites en collier de perles, dont l'aspect est également plus spécifique (Figure 15). Cependant, ces descriptions morphologiques ne suffisent pas pour affirmer le diagnostic car les blastes sont de morphologie variable, peuvent ressembler à des monoblastes ou à des cellules lymphoïdes (Figure 15). De plus, l'infiltrat blastique peut être absent notamment dans les cas de lésions cutanées isolées, et à l'inverse certaines présentations associent un infiltrat médullaire significatif associé à des cytopénies liées à cet envahissement. Cependant, le tableau de leucémie hyperleucocytaire est rare et une myélémie associée à la blastose est de mauvais pronostic⁹⁸.

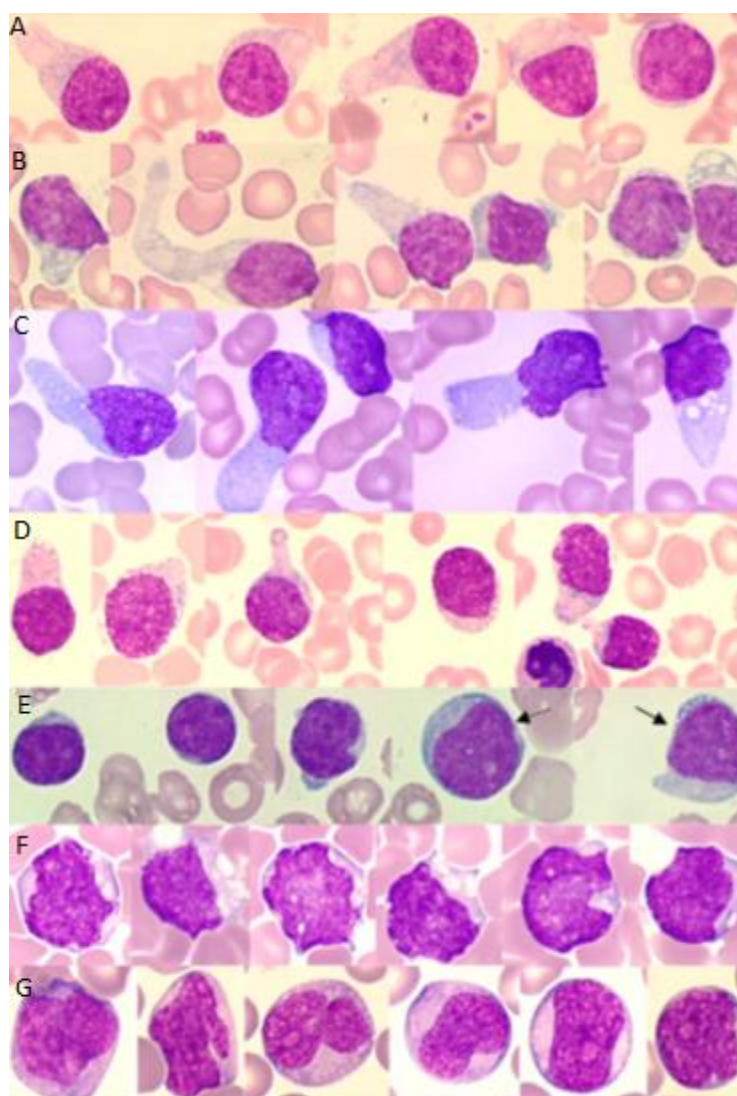


Figure 15 : Morphologie représentative des blastes de LPDC d'après Garnache *et al.*, 2019⁹⁸

La morphologie est très variable : (A-D) Morphologie typique avec prolongement cytoplasmiques de type pseudopodes, microvacuoles en collier de perle, noyau excentré et coloration hétérogène du cytoplasme (légèrement basophile avec des zones plus grises). (E) Morphologie lymphoïde avec cellules de petite taille, cytoplasme très peu abondant, et quelques cellules (fléchées) plus grandes avec une morphologie plus immature. (F-G) Morphologie monocytoïde évoquant des monoblastes, grandes cellules, plus basophiles à noyau irrégulier et nucléoles. Coloration May-Grundwald-Giemsa, grossissement x1000.

3.3. Marqueurs utilisés en immunohistochimie et en cytométrie en flux

Aucune de ces descriptions morphologiques n'est toutefois caractéristique des LPDC, et la recherche de marqueurs spécifiques est nécessaire pour confirmer le diagnostic. Tout d'abord, le CD4 et le CD56 ont été à l'origine des premières descriptions de cette hémopathie. Le CD56 est particulièrement intéressant, car exprimé uniquement dans une population minoritaire de pDCs physiologiques. Ainsi, des blastes exprimant à la fois le CD56 et des marqueurs de pDCs en absence des marqueurs de lignée T (CD3, cCD3), B (CD19), myéloïde (myéloperoxydase), monocyttaire (CD14) et épithéliale (kératine) orientent vers une LPDC. Parmi les marqueurs de lignée pDC, on retiendra le CD123 (IL3-RA) d'intensité élevée dans 100% des cas. Cependant, l'association du CD4, du CD56 et du CD123 peut également être rencontrée dans certaines LAM, et quelques rares cas de LPDC n'expriment pas le CD56^{98,141,142}. Le CD123 est certes exprimé dans 100% des cas, mais n'est pas un marqueur spécifique, puisqu'il est notamment exprimé dans la lignée monocyttaire, et fréquemment sur les blastes de LAM, bien qu'à un niveau plus modéré. C'est pourquoi, l'usage d'autres marqueurs plus spécifiques de la lignée pDC est indispensable, et surtout l'association de plusieurs marqueurs, notamment BDCA-2 (CD303), BDCA-4 (CD304), TCL1, CD2AP, Spi-B, IRF8 et BCL11A en immunohistochimie (IHC)^{100,137,138,143,144} ou en CMF^{42,97,145}. Le CD303 est ainsi fréquemment plus faible sur les blastes de LPDC par rapport aux pDCs physiologiques et même négatif dans 20 à 40% des cas, tandis que le CD304 peut être exprimé sur des monoblastes de LAM ou dans certaines LAL-B. En IHC, on retient la nécessité d'au moins 5 marqueurs positifs parmi le CD4, CD56, TCL1, CD303, CD123, BCL11A pour affirmer le diagnostic¹⁴⁶. En 2009, notre équipe a proposé un algorithme pour la confirmation diagnostique en CMF, basée sur la co-expression des CD4, CD56, CD123, CD303 et/ou CD304, et l'absence d'expression de marqueurs forts de lignée : CD3, CD11c, MPO, CD79a (Figure 16)⁹⁷.

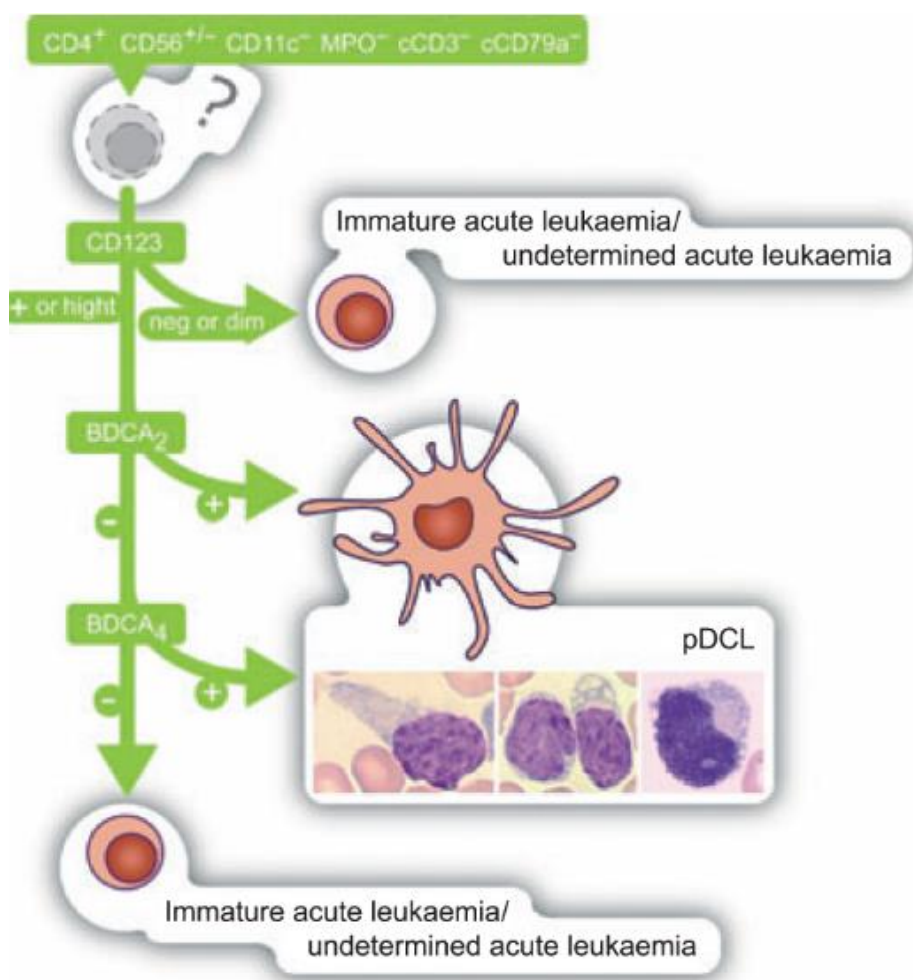


Figure 16 : Algorithme proposé en 2009 pour le diagnostic des LPDC, Garnache *et al.*, 2009⁹⁷

En 2012 nos travaux ont également démontré l'utilité de TCL1 (T-cell leukemia 1), notamment dans le diagnostic différentiel avec des LAM¹⁴⁵. Plus récemment, le marqueur TCF4 (E2-2), un facteur de transcription essentiel pour les LPDC¹⁴⁷, a été recherché en IHC par Sukswai *et al.*, en combinaison avec le CD123 : cette association apparaît comme très spécifique¹⁴⁸.

Malgré l'absence des marqueurs forts d'engagement dans les lignées T, B et myéloïdes, les blastes de LPDC peuvent tout de même exprimer certains marqueurs de ces lignées, en particulier les CD33, CD7, CD2, CD36, CD38 et CD22^{98,149}. Par conséquent, l'expression de ces marqueurs ne doit pas faire exclure le diagnostic de LPDC. C'est le cas pour nombre de caractéristiques morphologiques, phénotypiques mais aussi génétiques, abordées ci-après, retrouvées chez peu de patients (Figure 17).

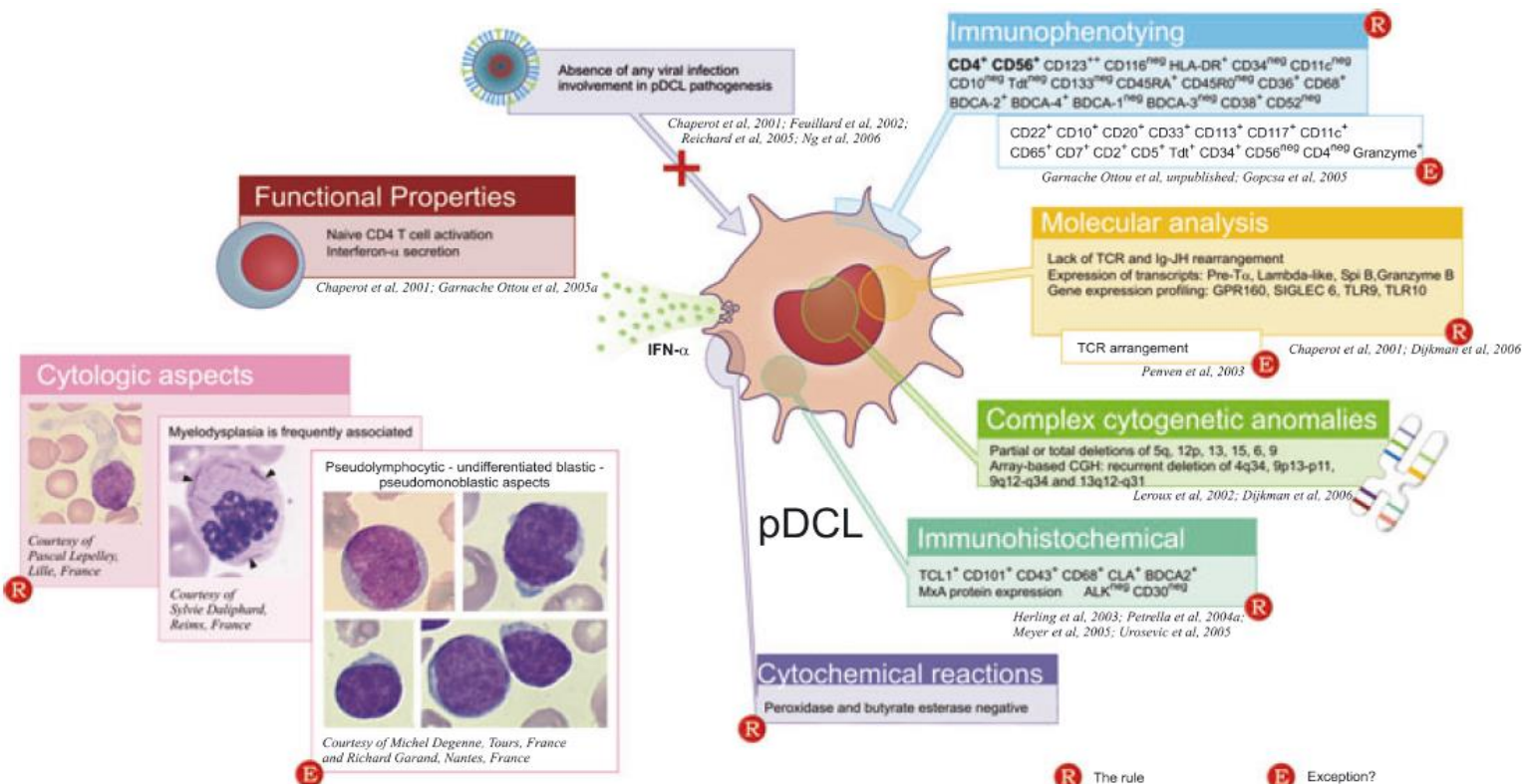


Figure 17 : Critères diagnostiques d'une LPDC, Garnache *et al.*, 2007¹⁵⁰

Les descriptions correspondant à une étiquette R (The rule) ont été validées par différents groupes, tandis que les descriptions E (Exception) correspondent à des petites cohortes, ou des sous-groupes de patients. pDCL, *plasmacytoid Dendritic Cell Leukemia*, c'est-à-dire les LPDC.

Enfin, l'existence de marqueurs différenciant les blastes de LPDC des pDCs physiologiques fait maintenant l'objet d'une attention particulière, dans l'optique de développer le suivi de maladie résiduelle dans cette pathologie. L'enjeu est alors de différencier les blastes tumoraux des pDCs réactionnelles. On mentionnera notamment le CD56, rarement exprimé sur les pDCs physiologiques, mais également la perte d'expression du CD2 et du CD303 sur les blastes, d'après une étude récente⁵².

4. Diagnostic différentiel

Le diagnostic des LPDC reste un enjeu en pratique clinique. En effet, il s'agit d'une hémopathie rare qui n'est donc pas forcément évoquée d'emblée. Les localisations peuvent être cutanées et/ou médullaires, demandant l'intervention pluridisciplinaire de dermatologues et/ou d'hématologues, d'anatomopathologistes et/ou de biologistes. De plus, les marqueurs phénotypiques sont divers, nécessitent d'être associés les uns aux autres pour un diagnostic de certitude. En effet, diverses entités peuvent mimer une LPDC :

- Les LAM indifférenciées expriment peu de marqueurs myéloïdes, sont MPO⁻ CD33⁺ et peuvent exprimer le CD4, le CD56 et le CD123. Ainsi, les trois marqueurs les plus faciles d'accès que sont les CD4, CD56 et CD123 ne doivent pas suffire au diagnostic. En revanche, les marqueurs de lignée pDCs seront négatifs dans de tels cas.
- Les LAM monoblastiques sont fréquemment CD4⁺, CD56⁺, HLA-DR^{high}, CD123⁺, CD36⁺, MPO⁻. Ces LAM expriment en général des marqueurs plus spécifiques de lignée monocyttaire (CD64, CD11c, CD14, CD15, CD65), même si les LAM les plus immatures peuvent ne pas les exprimer. De plus ces LAM n'expriment jamais le cTCL1 et le CD303.
- Les LAM avec envahissement cutané par les blastes, peuvent aussi faire évoquer une LPDC. Il s'agit plus fréquemment des LAM avec une différenciation monocyttaire, qui seront distinguées comme décrit plus haut.
- Les lymphomes NK/T CD56⁺ nasaux ou extranasaux figurent fréquemment dans la liste des hémopathies confondantes, ainsi que les lymphomes T cutanés¹⁵¹. Cependant, les lymphomes NK/T nasaux ou extranasaux sont fréquemment induits par le virus d'Epstein-Barr (EBV), expriment perforine et granzyme B in intracytoplasmique, ainsi que des marqueurs NK (CD16, CD57, TIA1) et/ou T (CD2, CD3, CD7) sans exprimer le CD4¹⁵².

A noter que les LPDC peuvent être associées à une autre hémopathie, de manière concomitante ou séquentielle^{99,115}. Ainsi, dans notre cohorte nationale, 15% de 109 patients ont présenté une autre hémopathie, auparavant, ou de manière concomitante^{97,98}. L'hémopathie associée est généralement une leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)¹⁵³⁻¹⁵⁵, mais il peut aussi s'agir d'un syndrome myélodysplasique (SMD)¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. Concernant les cas associant une LMMC, l'origine clonale commune aux deux hémopathies a été démontrée^{160,161}. Cela constitue un argument pour l'origine myéloïde des blastes de LPDC, d'autant que les hémopathies associées sont dans leur grande majorité d'origine myéloïde⁹⁹. Dans les rares cas associant également une hémopathie lymphoïde, aucune relation clonale n'a pu être démontrée, il pourrait s'agir d'une co-occurrence¹⁶²⁻¹⁶⁴. Cependant, de telles descriptions laissent planer la possibilité que les blastes de LPDC, comme les pDCs physiologiques peuvent dériver d'un progéniteur myéloïde, lymphoïde ou ayant les deux potentiels.

Enfin, la classification OMS alerte également sur l'importance de ne pas confondre ces LPDC caractérisées par la prolifération de blastes de lignée pDC avec d'autres hémopathies impliquant une prolifération de pDCs qualifiées de matures (PPDCM ou MPDCP pour *Mature pDC Proliferations*).

C. Prolifération de pDCs matures associées à une hémopathie

1. Définition

Les PPDCM ne sont pas formellement référencées dans la classification OMS, mais uniquement mentionnées comme un diagnostic différentiel des LPDC, sous la dénomination de *mature pDC proliferations associated with myeloid neoplasms*⁸³. Leur description est plus parcellaire que les LPDC, avec moins de 100 cas décrits, et de surcroît très hétérogènes^{55,143,165–170}. Comme pour les LPDC, les PPDCM touchent davantage les patients âgés, de sexe masculin (75% d'homme) avec une médiane d'âge de 69 ans^{165,171}. Les lésions cutanées et les atteintes ganglionnaires seraient fréquentes. Sur le plan cytologique, ces hémopathies se caractérisent par un excès de pDCs, qualifiées de matures en référence à leur morphologie non blastique, et aux caractéristiques plus proches des pDCs physiologiques. En effet, ces pDCs sont CD123^{fort} CD4⁺ CD303⁺ CD304⁺ CD34⁺, mais surtout, elles sont CD56⁻ avec un index prolifératif faible (Ki-67<10%), ce qui les distingue des blastes de LPDC. De plus, cet excès de pDCs se présente sous la forme d'agrégats sur les biopsies médullaires.

2. Hémopathies associées

Cette description regroupe toutefois des présentations très diverses, car l'excès de pDCs peut être associé à des hémopathies myéloïdes de différentes natures selon l'OMS. Il pourra s'agir d'une LMMC le plus fréquemment^{55,166,167,172,173}, mais aussi d'un SMD¹⁶⁸, d'une LMC^{166,174} ou également d'une LAM^{169,170,175–178}, ou de sarcomes myéloïdes avec fusion *CBFB-MYH11*¹⁷⁹. En pratique, une LMMC ou un SMD associé à un contingent de cellules de lignée pDC peut correspondre soit à une LPDC^{153,154,157,158,161} soit à une PPDCM^{55,166–168,172,173}, et les deux possibilités sont bien documentées. Notamment, l'expression du CD56, positif dans les LPDC, négatif dans les PPDCM permet d'orienter le diagnostic. En revanche, la présence de pDCs associés à une LAM correspondrait plus volontiers à une PPDCM qu'à une LPDC. En effet, seules deux études ont décrit l'association d'une LAM associée à une LPDC à notre connaissance, et le diagnostic de LPDC n'a pas été posé avec certitude. Dans la description de Khoury *et al.*, aucun marqueur de lignée pDC n'était alors réalisé en 2001 : ces cas de néoplasies cutanées CD56⁺ pourraient correspondre à des leucémies de LAM¹⁷². Dans l'article de Fracchiolla *et al.*, les pDCs sont CD56^{+/-}, il pourrait donc s'agir d'une PPDCM¹⁸⁰.

3. Caractère néoplasique des pDCs

Initialement décrites comme des pDCs réactionnelles, il apparaît à présent que l'excès de pDCs fait partie du clone tumoral, car elles présentent les mêmes anomalies génétiques que le clone leucémique associé. Cela a été démontré dans les LAM, par hybridation fluorescente *in situ* (FISH pour *Fluorescent In Situ Hybridization*) ou par biologie moléculaire sur plusieurs petites séries. Dans deux cas, une trisomie 8 est retrouvée dans les myéloblastes et dans les pDCs¹⁸¹, dans deux autres cas, la monosomie 7 du clone blastique est retrouvée dans les pDCs^{166,181}, idem dans un autre cas avec del(5q)¹⁷⁸. Dans cette dernière étude, le réarrangement *CBFB-MYH11* retrouvé chez 2 patients a été identifié par FISH *break-apart* dans les pDCs triées. Enfin, un réarrangement 11q23 (*KMT2A*) a également été confirmé dans les pDCs d'un autre cas d'une des ces études¹⁸¹. En biologie moléculaire, la démonstration d'un origine clonale néoplasique a également été publiée pour 3 patients d'une série de LAM avec excès de pDCs et duplication interne en tandem de *FLT3 (FLT3-ITD)*^{166,178,179,181,182}.

Dans les LMMC, les monocytes et les pDCs partagent le même profil mutationnel⁵⁵. Les anomalies retrouvées sont détaillées page 51 de ce manuscrit.

4. Maturation continue des myéloblastes vers les pDCs matures

Récemment, deux équipes indépendantes ont décrit concomitamment des LAM avec maturation continue vers la lignée pDC. Dans ces deux articles, les capacités de maturation des myéloblastes en pDCs matures sont conservées, avec expression progressive des CD123 et HLA-DR et perte du CD34 (Figure 18)^{169,170}.

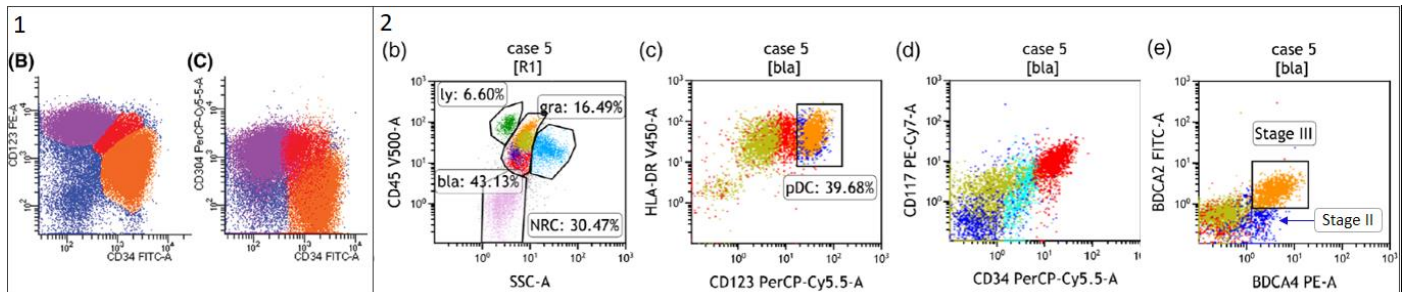


Figure 18 : Maturation progressive de myéloblastes de LAM en pDCs

Panel (1) adapté de Hamadeh *et al.*, 2020¹⁷⁰. Myéloblastes CD34⁺ CD117⁺ (orange), pDCs immatures CD34^{faible} CD123^{faible} (rouge), pDCs matures CD123^{fort} CD304⁺ (violet). Panel (2) adapté de Huang *et al.*, 2020¹⁶⁹. Exemples des 3 stades de maturation des pDCs dans des LAM. Lymphocytes, ly en vert ; myéloblastes, bla en rouge (stade I, MDP) ; monocytes en jaune kaki ; polynucléaires neutrophiles, gra en bleu ciel ; érythroblastes, NRC en rose ; pDCs en bleu roi et orange. (b) Les pDCs sont isolés des blastes sur l'expression CD123^{fort} HLA-DR^{fort}. (d) Expression des CD34 et CD117 (e) Discrimination des stades II (CDP, bleu roi, indiqués par une flèche) et III (pré-DCs et pDCs, orange) de maturation des pDCs en fonction de BDCA2 (CD303) et BDCA4 (CD304).

Hamadeh *et al.* présentent ainsi sept patients, 5 LAM, une LA biphénotypique et une hémopathie myéloïde de haut grade mal étiquetée¹⁷⁰. L'excès de pDCs CD56⁻ est compris entre 5 et 26% dans la MO sous forme d'infiltrat nodulaire ou interstitiel, avec pDCs circulantes pour 4 cas. A noter également que 3 de ces cas présentent une *FLT3-ITD*, en accord avec les données moléculaires précédemment publiées dans les MPDCP¹⁸², qu'un cas présente une trisomie 13 et un autre un gain de *RUNX1* (chromosome 21). La différenciation pDC peut également être associée à une différenciation monocyttaire, et 3 patients présentaient une LAM4 selon la classification FAB, c'est-à-dire une LA myélomonocytaire.

L'étude de Huang *et al.* présente 13 LAM et un SMD et retrouve les 3 stades de maturation physiologique des pDCs présentés par Martín-Martín *et al.*⁴⁶, en considérant l'expression des CD34, CD117, CD303, CD304, CD123, HLA-DR, CD4 et CD45. Cette maturation continue des myéloblastes en pDCs reproduit le phénotype des progéniteurs physiologiques GMDP, MDP et CDP¹⁶⁹. Sur le plan génétique, il s'agissait de LAM à caryotype normal ou avec anomalies du chromosome 7, 8 ou 20, avec *FLT3-ITD* pour 3 d'entre elles.

Ainsi, cette maturation continue implique la présence de myéloblastes, de pDCs immatures et de pDCs matures, ce qui pourrait faire d'emblée exclure le diagnostic de PPDCM, car on retrouve des pDCs immatures. C'est d'ailleurs ce que proposent les auteurs de ces deux papiers. Cependant, le terme « mature » dans la dénomination PPDCM se réfère davantage à un aspect morphologique non blastique qu'au caractère différencié des cellules, et ces descriptions sont en accord avec les caractéristiques publiées précédemment de pDCs CD56⁻ dans les MPDCP. Enfin, la définition d'une MPDCP ne reposant pas sur des critères consensuels, il apparaît tout à fait cohérent d'y intégrer l'ensemble des proliférations de pDCs au sens large, hors LPDC, précisément dans l'objectif d'affiner les critères diagnostiques de cette hémopathie.

III. Génétique somatique en onco-hématologie

A. Anomalies génétiques en onco-hématologie

En hématologie, les processus d'oncogénèse sont associés à des anomalies génétiques acquises par la cellule tumorale, qui lui confèrent un avantage sélectif vis-à-vis des cellules non néoplasiques. Il peut s'agir d'un avantage prolifératif, de capacités de survie augmentées, ou d'une instabilité génétique augmentant la probabilité de survenue d'anomalies génétiques additionnelles. Les anomalies génétiques acquises peuvent être des translocations avec production d'un transcrit de fusion, des pertes de matériel et donc de copies de certains gènes, des mutations perte de fonction, ou des mutations gain de fonction. Toutes ces anomalies contribuent à reprogrammer le réseau transcriptionnel de la cellule tumorale en dérégulant des voies clés pour la cellule.

1. Modèle de leucémogénèse en 2 étapes

Un modèle simple a d'abord été proposé pour la physiopathologie des LA avec deux événements séquentiels conférant à la cellule tumorale d'une part un blocage dans la différenciation normale et d'autre part un excès de prolifération (Figure 19). Le blocage de différenciation distingue les LA des hémopathies chroniques, et repose généralement sur l'altération d'un facteur de transcription impliqué dans la maturation hématopoïétique (mutations *CEBPA*, *RUNX1*, *GATA2*, réarrangements *CBFB-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RARA*, délétions *IKZF1*...), dont les anomalies sont mutuellement exclusives.

Le second événement confère un avantage prolifératif et/ou de survie lié à des mutations de gènes de voies de signalisation intracellulaire ou de récepteurs à activité tyrosine kinase (voies RAS avec *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *NF1*, *BRAF*, impliqués dans la prolifération cellulaire¹⁸³, JAK-STAT avec *JAK2*, *FLT3*, PI3K-AKT, *ABL*, *PDGFRA/B*, *FGFR1*, *KIT*). Il s'agit généralement de mutations gain de fonction, avec activation constitutives de voies de signalisation citées.

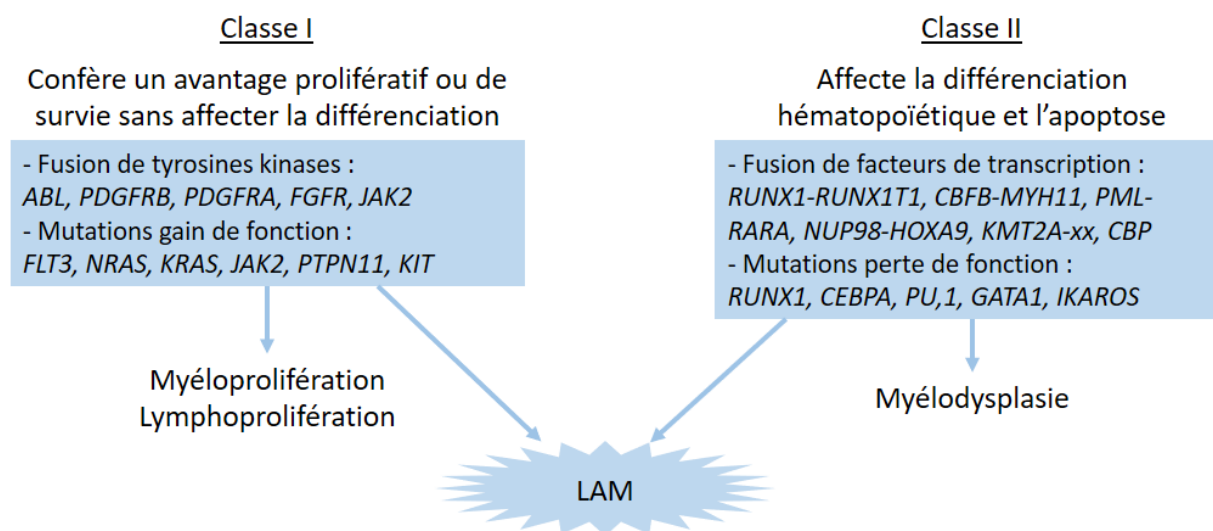


Figure 19 : Modèle de leucémogénèse des LA en 2 étapes, adapté de Kelly *et al.*, 2002¹⁸⁴

2. Autres catégories de gènes impactés

A ces deux premiers groupes de gènes s'ajoutent des mutations d'autres catégories géniques (Figure 20). Notamment, les gènes du spliceosome impliqués dans l'épissage peuvent être mutés, tels que *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1* et *ZRSR2* induisant des anomalies d'épissage des ARN pré-messagers. Egalement, les gènes permettant l'homéostasie épigénétique peuvent être impactés, dérégulant la méthylation de l'ADN (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*), l'intégrité de la chromatine par méthylation des histones via le complexe répresseur polycomb 2 (*ASXL1*, *EZH2*) ou les processus les régulant (translocations impliquant *KMT2A*, c'est-à-dire *MLL*). La nucléophosmie 1 codée par *NPM1* est une protéine nucléocytoplasmique multifonctionnelle qui peut être mutée, entraînant un export nucléaire de la protéine mutée, et une perte de ses fonctions nucléolaires (synthèse du ribosome, régulation transcriptionnelle, remodelage de la chromatine, réparation de l'ADN). Le complexe cohésine (*SMC1A*, *SMC3*, *STAG2*, *RAD21*) peut être impacté, avec une ségrégation chromosomique et des processus de réparation de l'ADN altérés, avec blocage de maturation. Enfin, les gènes suppresseurs de tumeur et notamment *TP53* peuvent être mutés dans tous les types d'hémopathies¹⁸⁵⁻¹⁸⁸ et de tumeurs solides¹⁸⁹. Une perte de fonction par mutation ou délétion induit une instabilité génétique et promeut l'émergence d'autres mutations, avec un pronostic défavorable.

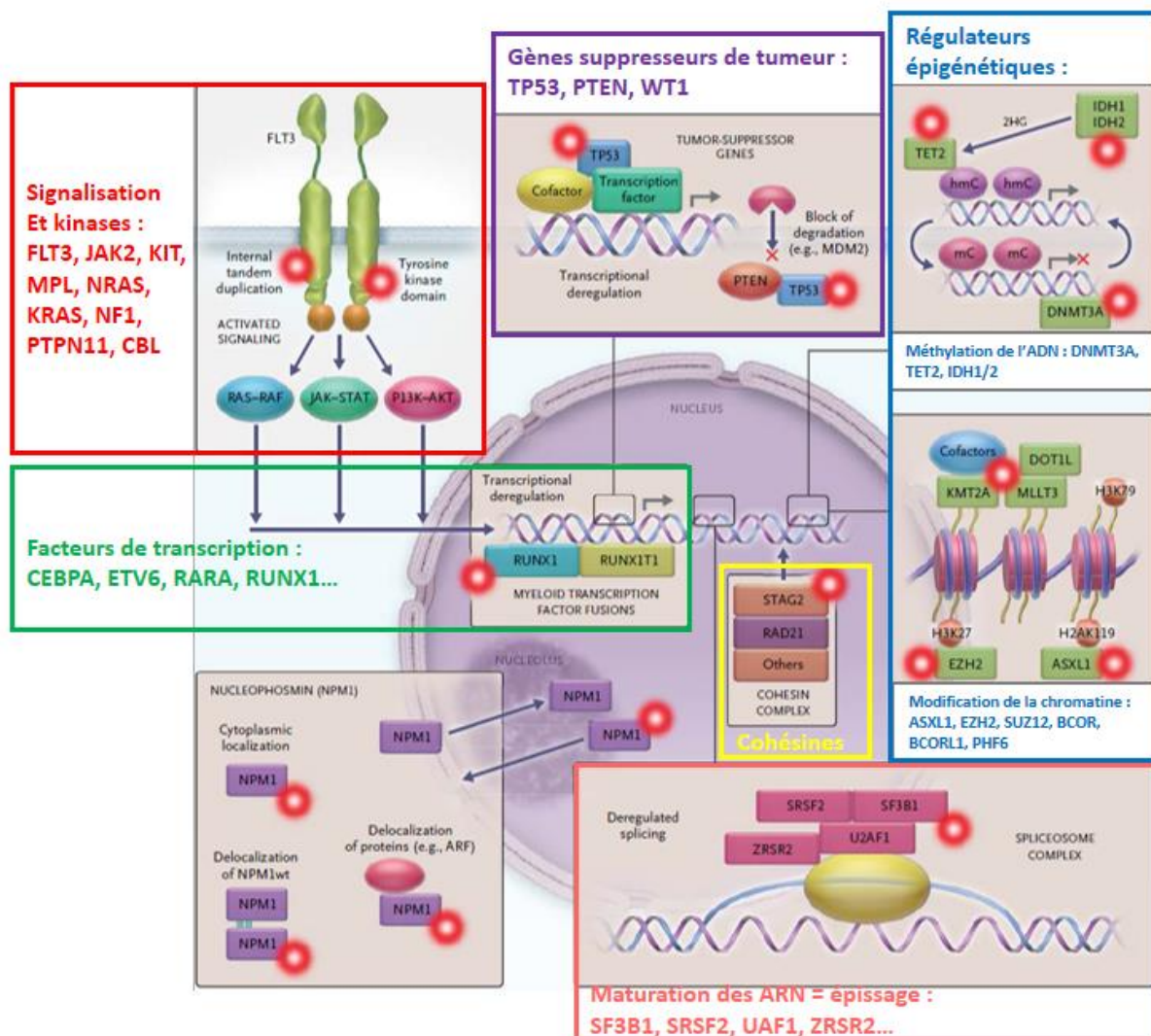


Figure 20 : Principales catégories de gènes mutés dans les LAM, adapté de Döhner et al., 2015¹⁹⁰

Huit catégories peuvent être distinguées : signalisation et récepteurs à tyrosine kinase en rouge conférant un avantage prolifératif ; facteurs de transcription en vert ; spliceosome en saumon ; complexe cohésine en jaune ; homéostasie épigénétique en bleu avec 2 catégories, d'une part la méthylation de l'ADN, et d'autre part l'intégrité de la chromatine ; gènes suppresseurs de tumeur en violet ; nucléophosmine aux fonctions nucléocytoplasmiques, notamment nucléolaires.

3. Modèle de leucémogénèse multi-étapes

Le modèle initialement proposé de leucémogénèse en deux étapes est par conséquent très incomplet et un modèle multi-étapes paraît plus fidèle à l'histoire naturelle de la maladie.

3.1. Mutations préleucémiques

Ainsi, le processus leucémogène serait multi-étapes, avec accumulation d'anomalies permettant la transformation en LA. On distingue d'abord des mutations dites initiatrices, présentes dès les stades pré-leucémiques, non spécifiques altérant l'épigénétique notamment (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1/2*). Ces anomalies sont présentes dès le stade d'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé (CHIP pour *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*)¹⁹¹ et leur fréquence augmente avec l'âge (Figure 21). Ces mutations prédisposent à l'acquisition d'anomalies ultérieures et donc aux hémopathies myéloïdes, des SMD¹⁹²⁻¹⁹⁴ aux LMMC^{195,196} et aux LAM^{192,197-199}.

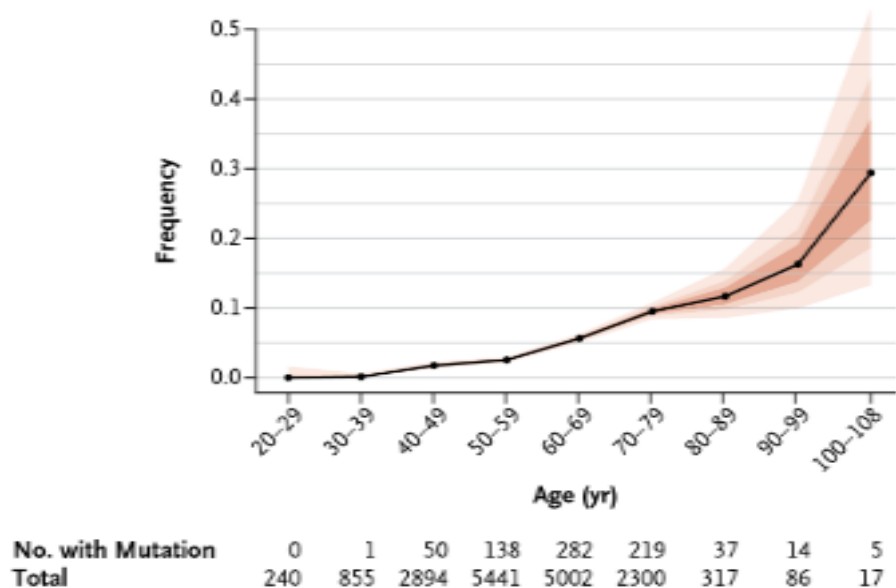


Figure 21 : Prévalence des mutations somatiques en fonction de l'âge, d'après Jaiswal *et al.*, 2014²⁰⁰

Les intervalles en marrons correspondent aux 50^{ème}, 75^{ème} et 95^{ème} percentiles.

3.2. Anomalies liées à la transformation et mutations de progression

Dans un second temps, surviennent des anomalies associées à l'évolution en hémopathie, dans les LAM : des mutations et translocations liées à la transformation, impliquant les facteurs de transcriptions et des mutations de progression, sous-clonales conférant un avantage prolifératif (*FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *KIT*). Les anomalies de facteurs de transcription ou de *NPM1* étant mutuellement exclusive, on classe les LAM principalement selon ces anomalies (Figure 22), avec ensuite des strates successives de mutations additionnelles sous-clonales.

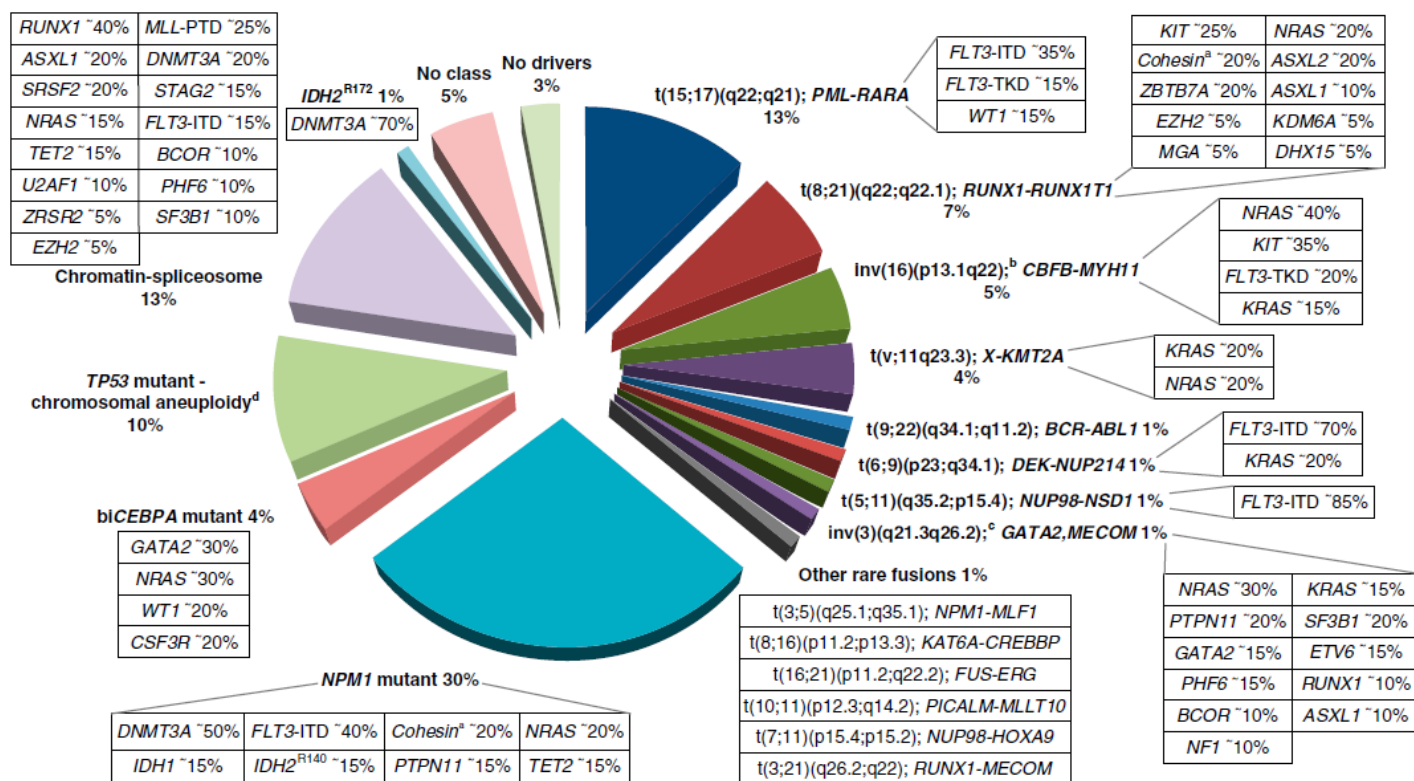


Figure 22 : Illustration de la diversité des anomalies retrouvées dans les LAM de l'adulte, d'après Döhner *et al.*, 2017²⁰¹

3.3. Impact pronostique

Ces diverses anomalies génétiques influencent le pronostic, et c'est la raison pour laquelle la classification OMS les distingue au sein d'entités bien définies, qui ont permis de stratifier le risque génétique des LAM. Ainsi, l'impact pronostique des anomalies est à présent hiérarchisé dans les recommandations de l'ELN (*European LeukemiaNet*), permettant de distinguer des LAM de pronostic favorable, intermédiaire et défavorable (Tableau 4)^{91,201,202}.

Tableau 4 : Classification OMS des LAM et des LAL-B avec anomalies récurrentes, et stratification pronostique des LAM selon l'ELN

A. : Classification OMS 2016 des LAM et des LAL-B avec anomalies récurrentes, adapté d'Arber *et al*, 2016⁹¹. Seules les classes avec anomalies récurrentes dans la classification OMS sont indiquées. B. Stratification du risque pronostique dans les LAM selon les recommandations de l'ELN, adapté de Döhner *et al.*, 2017²⁰¹. (a) Ratio de l'aire sous la courbe de *FLT3-ITD/FLT3* wild-type (faible si < 0.5 ; élevé si ≥ 0.5). (b) Quelles que soient les anomalies cytogénétiques associées. (c) Défini par 3 anomalies ou plus. (d) Défini par la présence d'une monosomie (sauf -X ou -Y) associée à au moins une autre monosomie ou une anomalie structurale.

A. Classification OMS 2016 des LAM et des LAL-B avec anomalies récurrentes	
LAM avec anomalies génétiques récurrentes	LAL-B avec anomalies génétiques récurrentes
LAM avec t(8;21)(q22;q22.1) ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	LAL-B avec t(9;22)(q34.1;q11.2) ; <i>BCR-ABL1</i>
LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) ; <i>CBFB-MYH11</i>	LAL-B avec t(v;11q23.3) ; <i>KMT2A</i> réarrangé
LA promyélocytaire avec <i>PML-RARA</i>	LAL-B avec t(12;21)(p13.2;q22.1) ; <i>ETV6-RUNX1</i>
LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3) ; <i>MLLT3-KMT2A</i>	LAL-B avec hyperdiploïdie
LAM avec t(6;9)(p23;q34.1) ; <i>DEK-NUP214</i>	LAL-B avec hypodiploïdie
LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) ; <i>GATA2-MECOM</i>	LAL-B avec t(5;14)(q31.1;q32.3) ; <i>IL3-IGH</i>
LAM avec t(1;22)(p13.3;q13.3) ; <i>RBM15-MKL1</i>	LAL-B avec t(1;19)(q23;p13.3) ; <i>TCF3-PBX1</i>
Entité provisoire : LAM avec <i>BCR-ABL1</i>	Entité provisoire : LAL-B <i>BCR-ABL1-like</i>
LAM avec mutation de <i>NPM1</i>	Entité provisoire : LAL-B avec <i>iAMP21</i>
LAM avec mutations bialléliques de <i>CEBPA</i>	
Entité provisoire : LAM avec mutation de <i>RUNX1</i>	
B. Stratification du risque pronostique selon les recommandations de l'ELN 2017	
Groupe pronostique	Anomalies génétiques
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1) ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) ; <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> muté sans <i>FLT3-ITD</i> ou ratio <i>FLT3-ITD</i> faible(a)(b) <i>CEBPA</i> muté biallélique(b)
Intermédiaire	<i>NPM1</i> muté avec ratio <i>FLT3-ITD</i> élevé(a)(b) <i>NPM1</i> sauvage sans <i>FLT3-ITD</i> ou ratio <i>FLT3-ITD</i> faible(a)(b) t(9;11)(p21.3;q23.3) ; <i>MLLT3-KMT2A</i> anomalies cytogénétiques non classées dans les autres groupes de risque
Défavorable	t(6;9)(p23;q34.1) ; <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3) ; réarrangement de <i>KMT2A</i> sauf t(9;11)(p21.3;q23.3) t(9;22)(q34.1;q11.2) ; <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) ; <i>GATA2-MECOM</i> -5 ou del(5q) ; -7 ; -17/anomalie 17p caryotype complexe(c), caryotype monosomal(d) <i>NPM1</i> sauvage et ratio <i>FLT3-ITD</i> élevé(a)(b) <i>RUNX1</i> muté <i>ASXL1</i> muté <i>TP53</i> muté

B. Anomalies génétiques dans les leucémies dérivées de pDC

Par analogie aux hémopathies, notamment myéloïdes, il apparaît primordial de caractériser le profil génétique des LPDC, afin de dégager des groupes éventuels de pronostic différents.

1. Profil transcriptionnel

Tout d'abord, le profil phénotypique des LPDC montre un engagement clair dans la lignée pDC et s'accompagne d'un programme transcriptionnel bien distinct des autres hémopathies^{109,203}. On note une faible expression de *RB1* and *LATS2* avec délétions 13q11-q14 tandis que certains oncogènes sont surexprimés, tels que *HES6*, *RUNX2* et *FLT3* ou la voie NF-κB sont impactés^{109,204}. Egalement, on retrouve une augmentation d'expression de *BCL2* et *IRF4*¹⁰⁹. Le métabolisme du cholestérol est aussi dérégulé, notamment les cibles de *LXR*, comme notre équipe a pu le montrer²⁰³.

Cependant, ces caractéristiques originales ne se traduisent pas par des anomalies génétiques simples, spécifiques et présentes chez tous les patients. En effet, les mutations retrouvées dans les LPDC évoquent un profil proche des SMD et des LAM. De plus, compte tenu de la rareté des LPDC, les données disponibles en génétique sont limitées par les faibles effectifs des cohortes et des approches hétérogènes. Notamment les mutations décrites ont fréquemment été identifiées grâce à des panels ciblés en séquençage haut débit (NGS pour *Next Generation Sequencing*). Ces panels ne se recoupent pas forcément les uns les autres et ont été réalisés sur des cohortes inférieures à 30 cas. A ces panels ciblés, s'ajoutent 22 séquençages d'exome complet (WES pour *Whole Exome Sequencing*) au total, dont les résultats publiés s'intéresse pour l'un d'entre eux aux transcrits de *MYB*, et pour un autre à l'épigénétique^{133,160,205}.

2. Anomalies génétiques

2.1. Anomalies myéloïde-like : altérations épigénétiques et du spliceosome

Comme dans les SMD, les altérations épigénétiques sont fréquentes, de la méthylation de l'ADN (*TET2*, *IDH1*, *IDH2*)^{103,133,140,161,183,196,205–210}, à la méthylation des histones (*ASXL1* et *EZH2*)^{103,133,136,161,183,205}, ou au remodelage de la chromatine (*ARID1A* et *SUZ12*) (Figure 23)^{103,133,205}. En 2019, Sapienza *et al.*, démontrent que la régulation épigénétique correspond au groupe de gènes le plus muté dans les LPDC, mais cela ne les distingue pas des SMD et des CHIP, en particulier chez le sujet âgé. Cependant, c'est un bon rationnel pour l'usage de molécules à action épigénétique, notamment la 5-azacytidine et la décitabine, comme démontré sur leurs modèles murins²⁰⁵.

Des réarrangements de *KMT2A* (*MLL*) avaient été décrits dans de rares cas de fusions *KMT2A-ENL*²¹¹ et *KMT2A-MLLT1*²¹². *KMT2A* joue un rôle dans le développement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et l'établissement des lignées lymphoïdes et myéloïdes, avec des réarrangements de *KMT2A* aussi bien dans les LAL que les LAM avec de très nombreux gènes partenaires (*ENL*, *ELL*, *AFF1*, *MLLT3*, *MLLT4*, *MLLT10*, ...) ²¹³. Cependant, ces descriptions dans des LPDC ont été remises en cause car les marqueurs les plus spécifiques des LpDC n'avaient pas été recherchés et il pourrait s'agir de LAM CD4⁺ CD56⁺, puisqu'elles constituent un diagnostic différentiel délicat¹⁴².

D'autres mutations fréquentes impactent l'épissage (*ZRSR2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*)²¹⁴ de manière similaire aux hémopathies myéloïdes ^{103,133,160,161,196,210,215–217}. C'est également le cas des voies de signalisation (*FLT3*, *KIT*, la voie Ras *NRAS*, *KRAS*) ^{133,161,208,209}. Ce profil est proche de celui des LMMC et est cohérent avec une origine clonale commune des cellules de LPDC et de LMMC chez quelques patients ayant présenté ces deux hémopathies^{160,161}

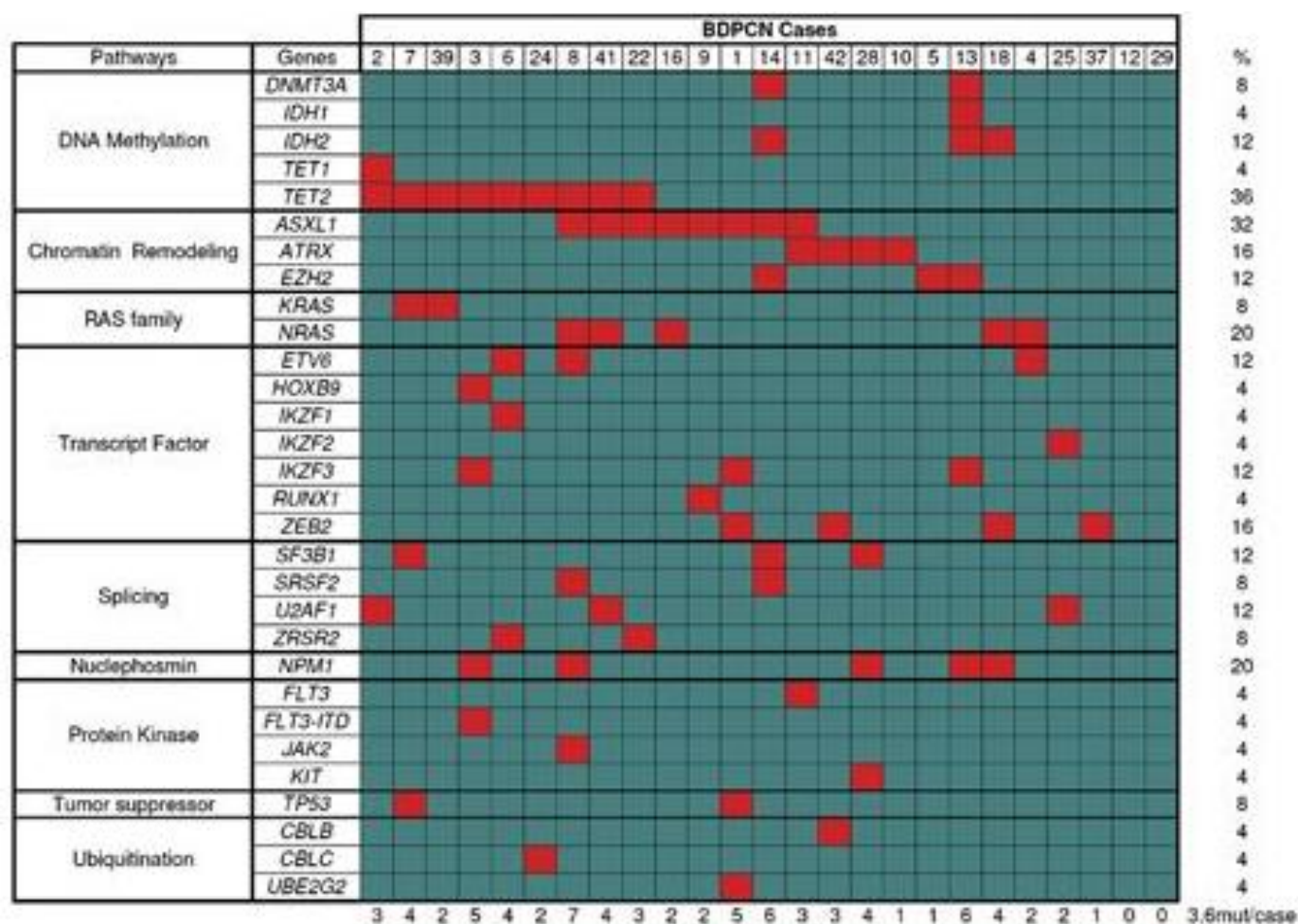


Figure 23 : Gènes fréquemment mutés dans les LPDC et leurs associations, d'après Menezes *et al.*, 2014¹³³

Les mutations épigénétiques, d'épissage et de voies de signalisation sont les plus fréquentes, comme dans les hémopathies myéloïdes.

2.2. Anomalies de facteurs de transcription

A ce profil myéloïde-like, s'ajoute d'autres anomalies « pan-hémopathies » ou lymphoïdes. Certains facteurs de transcription sont ainsi impactés, notamment *ETV6 (TEL)*, muté ou délété^{133,134,218–220}. *ETV6* est fréquemment altéré en hématologie, surtout par le biais de translocations, notamment la t(12;21)(p13.2;q22.1) *ETV6-RUNX1*, fréquente dans les LAL-B²²¹, les translocations t(5;12)(q32;p13.2) *ETV6-PDGFRB*, t(9;12)(p24.1;p13.2) *ETV6-JAK2* ou t(4;12)(q12;p13.2) *ETV6-PDGFRB* dans les syndromes hyperéosinophiliques, et d'autres translocations rencontrées dans de rares cas de LAM²²². Les mutations somatiques d'*ETV6* restent rares dans les LAM²²², mais elles peuvent aussi être germinales dans des thrombopénies familiales prédisposant aux LAM, SMD, LMMC, LAL-B ou aux myélomes multiples⁸³.

Les gènes de la famille *IKAROS (IKZF1/2/3)*, des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation lymphoïde²²³ et fréquemment mutés ou délétés dans les LAL²²⁴ peuvent l'être également dans les LPDC^{103,133,135,225}. *ZEB2*, peut également être altéré dans les LPDC²⁰⁸. Ce facteur de transcription est impliqué dans l'engagement et la fidélité de lignée des cellules myéloïdes et lymphoïdes à divers stades de l'hématopoïèse et aurait un rôle dans le développement de différents types d'hémopathies comme les LAM, LAL ou encore les lymphomes²²⁶.

Alors que les réarrangements chromosomiques impliquant des facteurs de transcriptions ont été largement décrits dans les LAL et LAM, peu de gènes clés étaient connus dans les LPDC avant 2017.

2.3. Réarrangements de MYC

A partir de 2018, des réarrangements de *MYC* (8q24), ont été décrits sur de grosses cohortes, dans environ 30% des cas^{108,207,225,227} avec une morphologie immunoblastoïde et un phénotype CD56- plus fréquents^{108,228}. Ces anomalies sont très similaires à celles retrouvées dans les lymphomes B de haut grade^{108,135,229,230}. Cependant, les partenaires sont différents de ceux des lymphomes, ainsi, partant d'un mécanisme lymphoïde-like de remaniement de *MYC*, l'implication de partenaires spécifiques pourrait orienter vers une différenciation pDC. Kubota *et al.* ont ainsi montré que *RUNX2* était le gène partenaire le plus fréquent, retrouvé dans les t(6;8)(p21;q24)²³¹. *RUNX2*, impliqué dans la différenciation et la migration des pDCs physiologiques est alors dérégulé^{231,232}.

2.4. Réarrangements de MYB

En 2017, d'autres réarrangements récurrents avaient été décrits chez 9 patients sur 14 d'une cohorte japonaise, comportant 5 enfants. Ces réarrangements créent des transcrits de fusion entre *MYB* et divers gènes partenaires avec translocation t(6;v)(q23;v)¹⁰³. *MYB* est un activateur transcriptionnel à localisation nucléaire interagissant avec le complexe C/EBP pour se lier à des séquences nucléotidiques diverses et ainsi stimuler la prolifération par transcription de *MYC*, *BCL2*, *c-KIT* et *c-ERBB2* et d'autres cibles (Figure 24). Il est exprimé de manière prédominante dans les cellules hématopoïétiques. Son expression diminue progressivement au cours de la différenciation cellulaire, avec une activité forte dans les CSH et les LT activés. Son activité est augmentée dans les hémopathies et dans certaines tumeurs solides, notamment rénales et du colon.

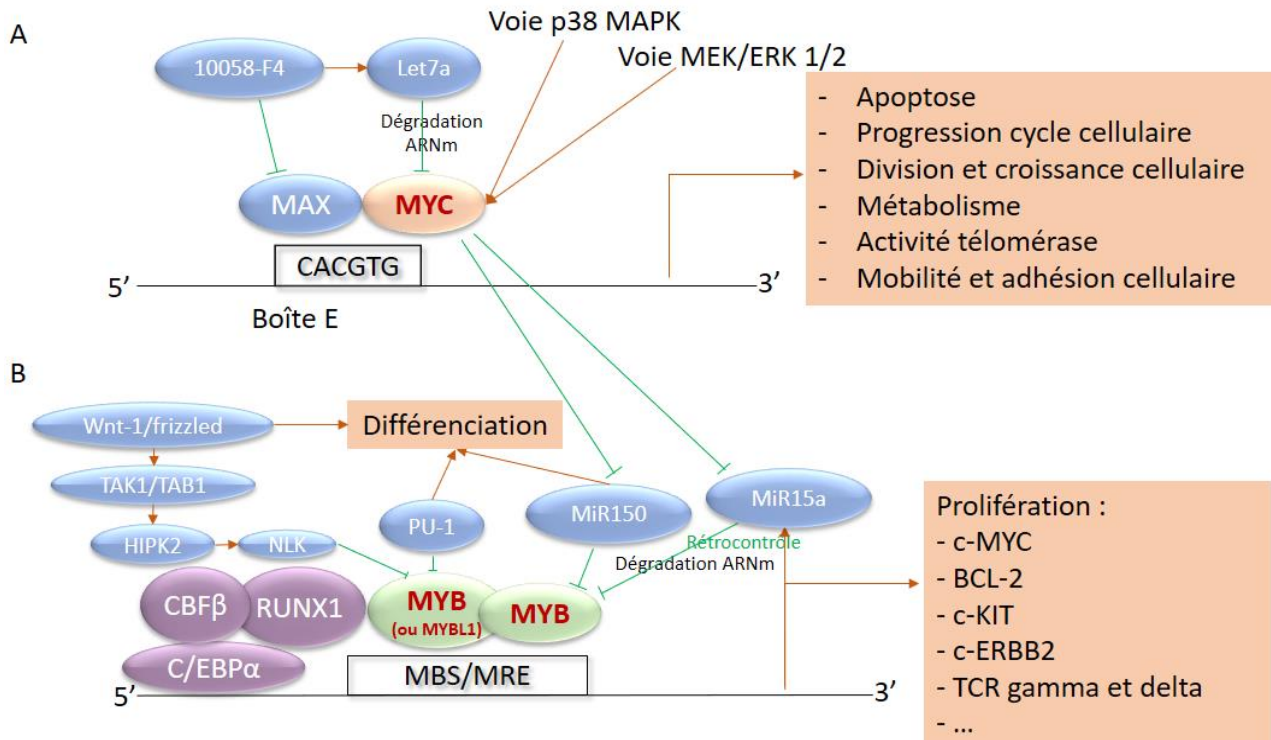


Figure 24 : Réseau d'interactions entre *MYB*, *MYC* et leurs cibles géniques

A. *MYC* est un puissant activateur transcriptionnel, sous dépendance des voies de signalisation intracellulaire de phosphorylation en cascade des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) et Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK) (Voies p38 MAPK et MEK/ERK 1 et 2). L'activation de *MYC* induit la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans la prolifération, la division, le métabolisme et la mobilité cellulaire ainsi que dans l'apoptose. B. *MYC* inhibe aussi des micro-ARN (MiR150 et MiR15a) capable à l'état basal d'éteindre l'expression de *MYB*. Une activation de *MYC* induit donc une activation de *MYB*, impliqué dans le complexe *core binding factor* (CBF) avec *CBFβ*, *RUNX1* et *CEBPA*. *MYB* est également un activateur transcriptionnel reconnaissant des séquences nucléotidiques multiples, au sein d'un complexe avec *CEBP*. Les gènes cibles sont impliqués dans la survie avec *BCL-2* et la prolifération cellulaire avec *c-KIT*, *c-ERBB2* et surtout *MYC*. Il en résulte une boucle d'activation entre les deux activateurs transcriptionnels. MBS, *MYB* binding site ; MRE, *MYB* recognition element.

Contrairement à *MYC*, *MYB* n'est qu'exceptionnellement réarrangé dans les hémopathies, en fait, uniquement dans de rarissimes cas de LA à basophiles à transcrits *MYB-GATA1*, plus rares encore que les LPDC²³³ et dans les LAL-T à t(6 ;7) avec duplication de *MYB*²³⁴. Les translocations de *MYB* sont également rapportées dans 60 à 80% des carcinomes adénoïdes kystiques (ACC), principalement avec le transcrit de fusion *MYB-NFIB*^{235,236}, et dans les gliomes pédiatriques²³⁷. Pour la première fois, des transcrits de fusion apparaissent comme récurrents et spécifiques des LPDCs par rapport aux autres hémopathies. *MYB* pourrait jouer un rôle dans le processus de transformation leucémique, de manière similaire aux LA à basophiles avec réarrangements *MYB-GATA1*. Toutefois, la fréquence des réarrangement de *MYB* est très incertaine, peut-être plus élevée chez les patients jeunes, comme le suggère l'étude princeps¹⁰³. Un analogue de *MYB*, *MYBL1* pourrait également être réarrangé de manière très similaire, avec un impact fonctionnel identique¹⁰⁸. De manière intéressante, les anomalies de *MYB*, *MYBL1* et *MYC* seraient mutuellement exclusives, délimitant des groupes distincts de patients.

2.5. Délétions de NR3C1

Les récepteurs aux glucocorticoïdes sont aussi impactés dans les LPDC, notamment *NR3C1* lors de délétions 5q31, et le réseau français d'étude des LPDC a ainsi montré l'impact pronostique défavorable de ces délétions (Figure 25)¹³⁶. Les délétions de *NR3C1* entraînent une haploinsuffisance avec baisse d'activité des récepteurs aux glucocorticoïdes, qui impacterait le complexe polycomb, en particulier *EZH2*, avec dérégulation du locus *HOXA* et différenciation dendritique plasmocytoïde.

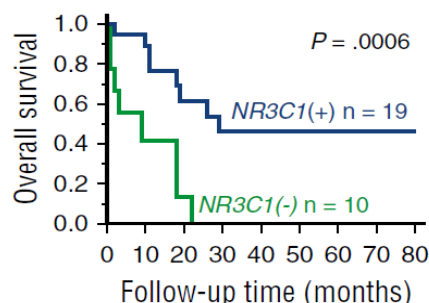


Figure 25 : Courbes de survie cumulative de Kaplan-Meier en fonction du statut *NR3C1*, d'après Emadali *et al.*, 2016¹³⁶.
NR3C1(-) : délété pour *NR3C1* ; *NR3C1(+)* : non délété pour *NR3C1*.

2.6. Altérations de gènes suppresseurs de tumeurs ou impliqués dans le cycle cellulaire

Sont également retrouvées dans les LPDC, des mutations inactivant les gènes suppresseurs de tumeurs, comme *TP53*^{133,206,209,218}, responsable d'une instabilité génétique. Le gène suppresseur de tumeur *ATM*, muté dans les processus lymphoprolifératifs²³⁸ peut également être muté dans les LPDC²⁰⁹, tandis que *RB1* impliqué dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire peut être muté ou délété^{103,209,218,220}. Initialement décrit dans le rétinoblastome, dans lequel il a permis de modéliser le principe de gènes suppresseurs de tumeurs²³⁹, *RB1* est également rapporté dans la LLC et les LAL²⁴⁰. Les gènes *CDKN1B/CDKN2B/CDKN2A* ont également un rôle dans la transition G1/S et leur délétion est rapportée dans plusieurs études sur les LPDC^{135,209,218-220}, de manière similaire aux LAL²⁴⁰ et lymphomes²⁴¹. Cette altération de régulation du cycle cellulaire pourrait avoir un rôle crucial dans l'oncogenèse des LpDC²¹⁸.

2.7. Profil génétique global

Globalement, on retrouve dans les LPDC de nombreuses délétions, conduisant à des caryotypes complexes avec pertes chromosomiques 9p21.3 (*CDKN2A/CDKN2B*), 12p13.2-p13.1 (*CDKN1B, ETV6*) ou 7p12.2 (*IKZF1*)^{134,135,220}. Malgré une multitude d'anomalies récurrentes, il est difficile de citer une anomalie génétique clé dans les LPDC. Quatre gènes sont particulièrement délétés ou mutés : *IKZF1*, requis pour la différenciation pDC²²⁹; *RB1*, potentiellement associé à la transformation en cas d'inactivation biallélique¹⁶⁰, *ETV6*, dont la délétion correspondrait à un événement pathogénique précoce²⁴² et *NR3C1*. Les activateurs transcriptionnels *MYC* et *MYB* sont également réarrangés de manière originale dans cette hémopathie. C'est l'association d'anomalies plutôt myéloïdes avec des anomalies lymphoïdes qui constitue l'élément le plus caractéristique des LPDC (Figure 26). Associé aux anomalies « pseudo-myéloïdes » altérant l'épigénétique, l'épissage et les voies de signalisation, un cortège d'anomalies « lymphoïde-like » sont présentes, des réarrangements de *MYC*, aux délétions d'*IKZF1*, *CDKN2A/B* et *ETV6*.

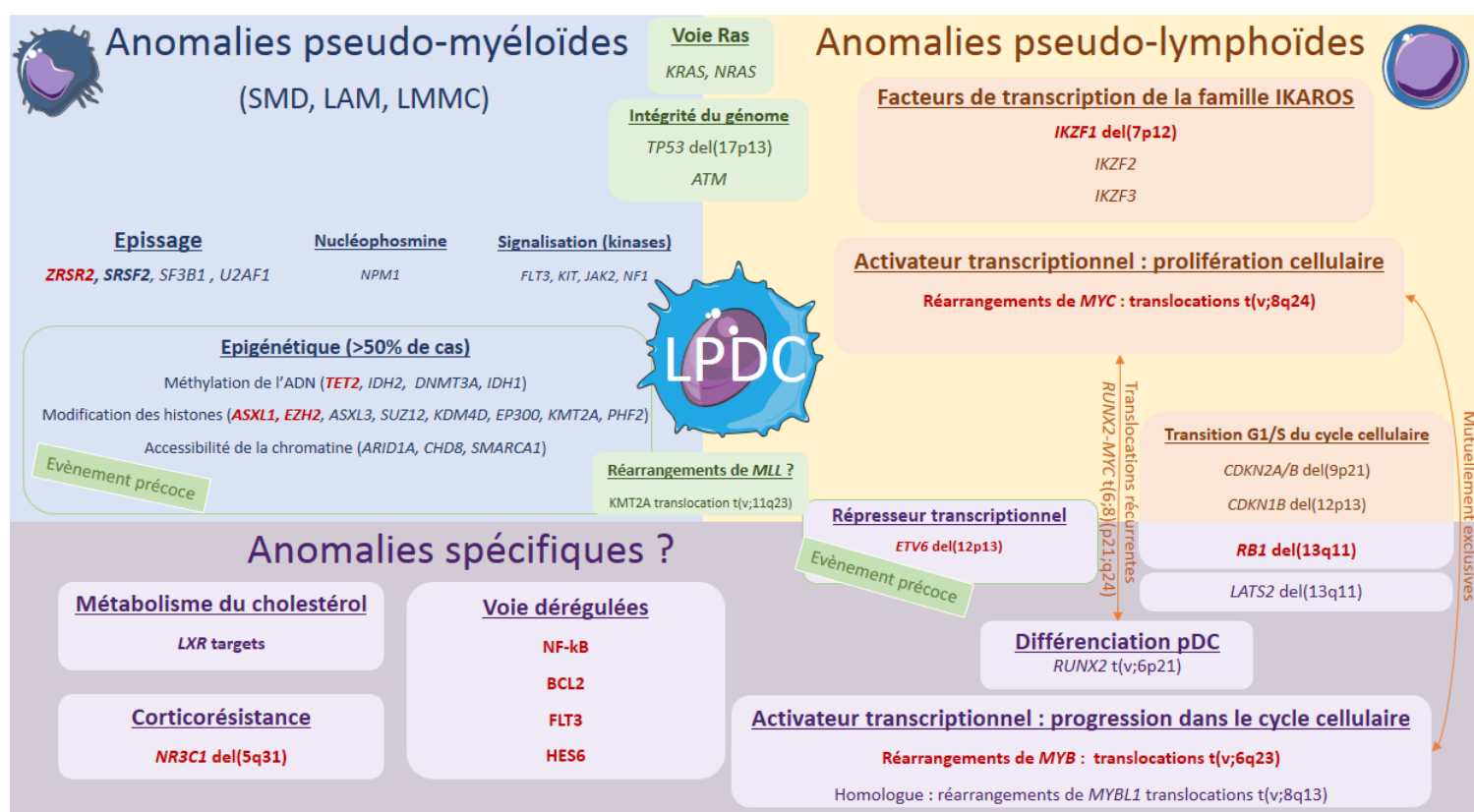


Figure 26 : Anomalies génétiques dans les leucémies dérivées de pDC

Un paysage génétique et transcriptomique complexe avec un profil mixte myéloïde-lymphoïde et des anomalies originales, absentes des autres hémopathies.

C. Anomalies génétiques dans les proliférations de pDCs matures

A l'inverse des LPDC, reconnues dans la classification OMS, les PPDCM ne correspondant pas à une entité individualisée et il n'est pas acquis qu'il s'agisse d'une entité unique et bien homogène.

1. LAM-pDC

Dans les LAM, aucune étude ne décrit d'anomalies sur une cohorte conséquente. On peut toutefois noter la présence d'anomalies non spécifiques, correspondant aux anomalies de l'hémopathie myéloïde associée : caryotypes simples avec pertes chromosomiques isolées de type del(5q), monosomie 7, trisomie 8, réarrangement 11q23 (*KMT2A*), inv(16) (*CBFB-MYH11*)²⁴³, trisomie 20 et mutations *FLT3-ITD*^{166,169,170,178,179,181,182}. Comme explicité ci-dessus, le caractère néoplasique des pDCs a ainsi été démontré le plupart du temps par FISH sur des séries de 2 ou 3 cas en objectivant une del(5q), une monosomie 7, une trisomie 8, un réarrangement 11q23 ou un inv(16). Les seules anomalies moléculaires décrites sont ainsi la présence du transcrit *CBFB-MYH11*^{178,179,243} et la duplication *FLT3-ITD*^{169,170,182}.

2. LMMC-pDC

Dans les LMMC, l'étude la plus exhaustive sur le plan mutationnel a été réalisée par l'équipe d'E. Solary, (Lucas *et al.* 2019)⁵⁵. Les voies les plus impactées sont la voie Ras (*NRAS*, *KRAS*, *NF1*, *CBL*, *PTPN11*, *PTPN13*), les régulateurs épigénétiques (*TET2*, *ASXL1*), l'épissage (*SRSF2*) et les voies de signalisation intracellulaires (*CSF3R*, *BLNK*) (Figure 27)⁵⁵.

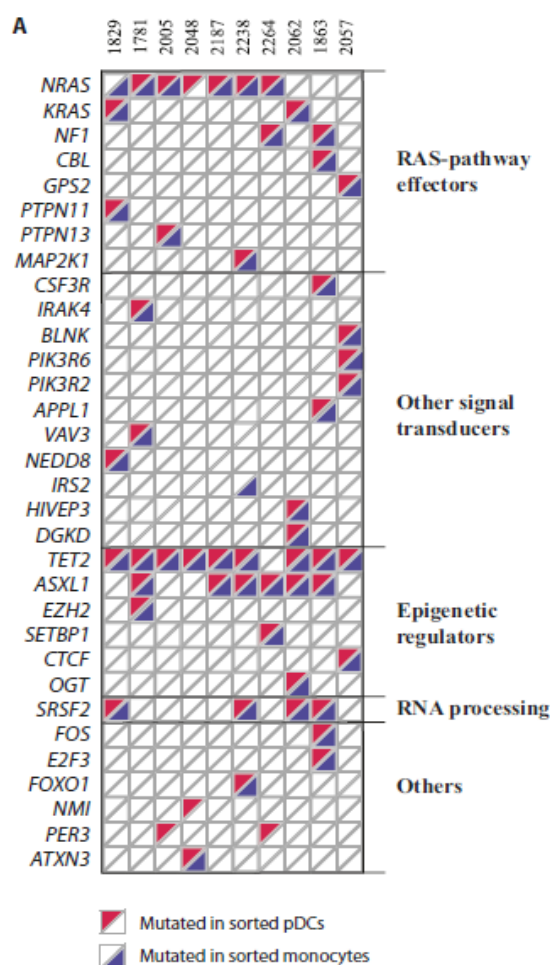


Figure 27 : Profil mutationnel des monocytes et pDCs de 10 LMMC, d'après Lucas *et al.*, 2019⁵⁵

Séquençage exome complet des monocytes, pDCs et LT de moelles osseuses de LMMC. Mutations dans les pDCs en rouge, dans les monocytes en bleu. Gènes regroupés par familles : *RAS-pathway effectors*, voie Ras ; *Other signal transducers*, autres signalisation ; *Epigenetic regulators*, régulateurs épigénétiques, *RNA processing*, épissage ; *Other*, autres.

Objectifs

I. Rationnel scientifique

La description récente des AS-DCs a fait émerger l'hypothèse que la nature exacte de la cellule d'origine des LPDC n'est pas si bien définie. En effet, s'agit-il vraiment de pDCs canoniques ? Ou d'AS-DCs ? Ou peut-on envisager que toutes les LPDC ne soient pas issues du même type de cellule d'origine ? Les données actuelles montrent que la lignée cellulaire CAL-1, dérivée de cellules d'un patient atteint de LPDC avec réarrangement de *MYC*, présente un profil proche des AS-DC, avec le phénotype suivant : AXL⁺ SIGLEC1⁺ IGLL1⁺ BCL11A⁺ ID2⁺ SPIB⁺ SPI1⁺ PAX5⁻ TCF3⁻ ID3⁻ ^{73,108}. Cependant, le phénotype des LPDC est variable, avec une expression non systématique de certains marqueurs associés aux AS-DCs, notamment les CD22, CD2 et CD33⁹⁸, alors que les marqueurs les plus spécifiques des AS-DCs ne sont pas recherchés dans les LPDC. De plus, d'autres marqueurs de lignée lymphoïde ou myéloïde, ne correspondant pas au phénotype AS-DC, sont parfois exprimés, tels que les CD7, cCD79a, CD117 et/ou CD15^{42,97,98}. Cette hétérogénéité est également fonctionnelle, puisque les blastes de LPDC ne sont pas capables de sécréter de l'IFN-α chez tous les patients⁸⁹.

Les PPDCM sont très mal caractérisées sur le plan génétique, ne permettant pas de dégager des entités claires. Les critères diagnostiques de ces pathologies sont encore aujourd'hui trop imprécis et ces hémopathies sont potentiellement sous-estimées.

II. Objectifs de l'étude

L'objectif du projet de thèse a été de mener une analyse génétique et transcriptomique des hémopathies à pDCs. Ce projet est donc constitué d'une partie I pour l'étude des LPDC, et d'une partie II pour l'étude des PPDCM.

Concernant les LPDC, nous avons souhaité mener une étude génétique et transcriptomique afin de préciser le profil génétique des LPDC et de le lier aux dérégulations d'expression génique retrouvées dans cette pathologie. Cette étude a été menée à la lumière des données actuelles concernant les pDCs canoniques et les AS-DCs.

Concernant les PPDCM, nous nous sommes intéressés aux PPDCM associées aux LAM, appelées LAM-pDC par la suite. Il s'agissait de préciser l'origine tumorale des pDCs, le phénotype à la fois des blastes et des pDCs et les mutations récurrentes présentes dans ces LAM-pDC.

I. Matériel et méthodes

Les techniques utilisées pour l'Article 1 ne sont que brièvement décrites ici, car elles sont abordées à travers l'article, tandis que d'autres techniques faisant l'objet d'études non encore publiées sont davantage détaillées ci-après, en particulier la LD-RTPCR ((Ligation-Dependent Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction)).

A. Matériel biologique et analyse phénotypique

1. Matériel biologique

Au fil des travaux réalisés par notre équipe, Besançon a développé une expertise nationale, nous positionnant comme un centre de référence pour les LPDC, notamment en cytologie, en CMF et en thérapeutique, dans le cadre du diagnostic de certitude, de protocoles cliniques et d'avis thérapeutiques^{42,97,98,145,244}. Les travaux menés à l'UMR1098 ont permis de constituer une des plus grandes cohortes de LPDC au monde avec plus de 200 cas référencés (numéro d'autorisation de collecte #DC2016-2791), incluant les données cliniques et biologiques de 86 cas⁹⁸. Au sein de cette cohorte, des cellules congelées, de l'ADN et de l'ARN a pu être conservé pour une partie des patients, à des fins de recherche. Treize de ces patients ont fait l'objet d'une étude transcriptomique et génétique dans le cadre de l'Article 1 de ce manuscrit.

2. Analyse phénotypique

Les profils phénotypiques ont été réalisés de manière prospective par CMF en utilisant un FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA), dans le cadre du réseau national LPDC, pour confirmation diagnostique. Lorsque nécessaire, des compléments d'immunophénotypage ont été réalisés sur cellules congelées.

B. Analyse moléculaire

1. Analyse transcriptomique

Douze prélèvements de MO ou de sang de LPDC ont été comparés à 164 échantillons de LA par analyse transcriptomique sur puces à ARN HG U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, USA). Après analyse, 13 LPDC ont été analysées, une LAL-T immature ayant été reclassée en LPDC, comme détaillé dans les résultats, article 1.

Cette étude s'intéressant plus particulièrement aux LPDC est issue d'un travail collaboratif sur les LA immatures, menées conjointement par l'INSERM UMR-S-1172, CHU de Lille, Lille (Pr. Claude Preudhomme, Dr. Christophe Roumier), l'INSERM U1151, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris (Pr. Vahid Asnafi, Pr. Elizabeth Macintyre) et l'INSERM UMR1098-Unité RIGHT, Besançon (Pr. Francine Garnache-Ottou). Ces données ont également été comparées aux profils publiés de cDCs et pDCs physiologiques (GSE28490: GSM705321-25 et 29-33).

2. Etude de variation du nombre de copies

Les variations du nombre de copies (CNV pour *Copy Number Variations*) ont été obtenues par analyse sur puces à ADN Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, USA) pour 13 patients d'intérêt en collaboration avec l'INSERM UMR-S-1172, CHU de Lille, Lille (Pr. Claude Preudhomme, Dr. Christophe Roumier).

3. Séquençage haut débit (NGS) ciblé

Les études de NGS ciblé ont été réalisées grâce à des designs HaloPlex^{HS} (Agilent, Santa Clara, CA, USA) pour Illumina (Tableau 5), puis les librairies obtenues ont été séquencées sur MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). L'analyse bioinformatique a été réalisée en collaboration avec l'UMR1245 à Rouen (P-J Viailly). A partir de gènes usuellement étudiés en onco-hématologie, le panel a été enrichi de gènes plus spécifiquement mutés dans les LPDC. Les 13 patients analysés sur puces à ARN HG U133 Plus 2.0 et sur puces à ADN GW Human SNP Array 6.0 ont été séquencés. A noter que ce panel LPDC a été mis à profit sur une cohorte plus importante : au total 83 patients atteints de LPDC issus de notre collection ont été séquencés et feront l'objet d'autres analyses ultérieures aux travaux présentés ici.

Tableau 5 : panel de gènes du design HaloPlex^{HS} Target Enrichment System pour Illumina dans les LPDC

Nom du gène	Taille (pb)	Transcrit
<i>APC</i>	2185	NM_001127511
<i>ARID1A</i>	6839	NM_139135
<i>ASXL1</i>	2906	NM_015338
<i>ATM</i>	9556	NM_000051
<i>ATRX</i>	7745	NM_138270
<i>BCL6</i>	2121	NM_001134738
<i>BCOR</i>	6115	NM_001123385
<i>BCORL1</i>	5124	NM_021946
<i>BIRC3</i>	734	NM_001165
<i>BRAF</i>	49	NM_004333
<i>BTK</i>	1986	NM_000061
<i>CALR</i>	1254	NM_004343
<i>CARD11</i>	1121	NM_032415
<i>CBL</i>	336	NM_005188
<i>CD79A</i>	115	NM_001783
<i>CD79B</i>	42	NM_000626
<i>CDKN2A</i>	1047	NM_001195132
<i>CEBPA</i>	1077	NM_004364
<i>CIC</i>	4807	NM_001304815
<i>CRIPAK</i>	1340	NM_175918
<i>CSF3R</i>	2697	NM_000760
<i>CXCR4</i>	1043	NM_001008540
<i>DNMT3A</i>	4057	NM_022552
<i>ETV6</i>	1358	NM_001987
<i>EZH2</i>	2530	NM_001203247
<i>FBXW7</i>	619	NM_033632
<i>FLT3</i>	3004	NM_004119
<i>GNB1</i>	160	NM_001282539
<i>HOXB9</i>	236	NM_024017
<i>IDH1</i>	100	NM_005896
<i>IDH2</i>	161	NM_002168
<i>IKZF1</i>	1553	NM_001220771
<i>IKZF2</i>	1590	NM_001291845
<i>IKZF3</i>	1522	NM_016260
<i>JAK2</i>	216	NM_004972
<i>KIT</i>	551	NM_000222
<i>KRAS</i>	460	NM_004985
<i>MET</i>	721	NM_000245
<i>MLH1</i>	80	NM_001258274
<i>MPL</i>	97	NM_005373
<i>MYD88</i>	452	NM_001172568
<i>NEFH</i>	2541	NM_021076
<i>NOTCH1</i>	2286	NM_017617
<i>NOTCH2</i>	2091	NM_024408
<i>NPM1</i>	38	NM_002520
<i>NRAS</i>	290	NM_002524
<i>PAX3</i>	1508	NM_181458
<i>PHF6</i>	1089	NM_001015877
<i>PTEN</i>	406	NM_000314
<i>PTPN11</i>	347	NM_002834
<i>RB1</i>	481	NM_000321

Nom du gène	Taille (kb)	Transcrit
<i>RET</i>	403	NM_020975
<i>RHOA</i>	42	NM_001313941
<i>RUNX1</i>	1385	NM_001001890
<i>SF3B1</i>	999	NM_012433
<i>SHOC2</i>	100	NM_001324336
<i>SRSF2</i>	362	NM_003016
<i>STAT3</i>	656	NM_003150
<i>TCL1A</i>	710	NM_001098725
<i>TET2</i>	6071	NM_001127208
<i>TNFAIP3</i>	2373	NM_001270507
<i>TP53</i>	1182	NM_001126112
<i>U2AF1</i>	904	NM_000546
<i>UBE2G2</i>	493	NM_182688
<i>VHL</i>	640	NM_000551
<i>WT1</i>	1564	NM_024426
<i>ZEB2</i>	3637	NM_014795
<i>ZRSR2</i>	1457	NM_005089

4. Recherche de transcrits de fusion impliquant MYB par LD-RT PCR

Les réarrangements de MYB et MYC étant relativement spécifiques des LPDC, il nous est apparu intéressant d'explorer les différentes possibilités techniques de les détecter. Le caryotype peut permettre de détecter une translocation réciproque, mais avec les limites suivantes. Tout d'abord, les deux tiers des patients présentent des caryotypes anormaux, fréquemment complexes, dans lesquels il peut être difficile d'identifier les chromosomes partenaires d'une translocation¹³⁴. Ensuite, des translocations cryptiques sont possibles, notamment chez le tiers restant des patients pour lesquels aucune anomalie n'est détectée au caryotype. La FISH constitue une technique complémentaire exhaustive, permettant de détecter l'ensemble des translocations impliquant soit MYC, soit MYB lorsque des sondes spécifiques d'un locus (Locus Specific Identifier) de type double couleur *break-apart* sont utilisées. Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle ne permet pas d'identifier le gène partenaire.

En biologie moléculaire, il est possible de détecter divers transcrits de fusion simultanément par des techniques multiplexes de LD-RT PCR (*Ligation-Dependent Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction*), autrement appelées RT-MLPA (*Reverse Transcription-Multiplex Ligation Probe Amplification*). Cette technique a été mise à profit dans le cadre des LA, où plus de 50 réarrangements géniques récurrents peuvent être détectés grâce à un mix oligonucléotidique de 240 amorces conçu par Ruminy *et al.*, UMR1245 (Figure 28)²⁴⁵.

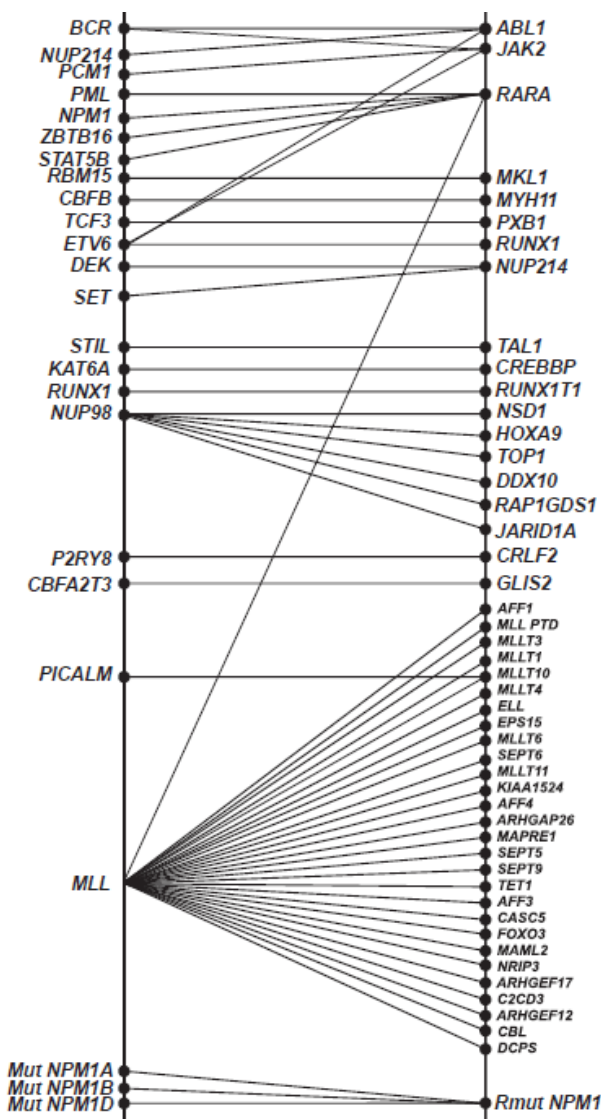


Figure 28 : Représentation schématique de l'essai LD-RT PCR d'après Ruminy *et al.*, 2016²⁴⁵

57 réarrangements sont ciblés, correspondant à 66 gènes partenaires et 3 mutations de NPM1. Pour de nombreux gènes, plusieurs points de cassure sont possibles, correspondant à différents exons impliqués dans les transcrits de fusion.

Brièvement, après rétrotranscription, l'échantillon d'ADN complémentaire est incubé avec le mix d'amorces à façon. Si un transcrit de fusion est présent, les 2 sondes correspondant aux 2 gènes impliqués s'hybrident côte à côte. Cette technique utilise les réactifs de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) commercialisés par MRC Holland (MRC Holland, Amsterdam, Pays-Bas). Une étape de ligation permet la création d'une liaison covalente entre les 2 sondes puis une amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est réalisée grâce aux amorces universelles U1 et U2. Une étape de séquençage permet ensuite d'identifier les gènes partenaires (Figure 29).

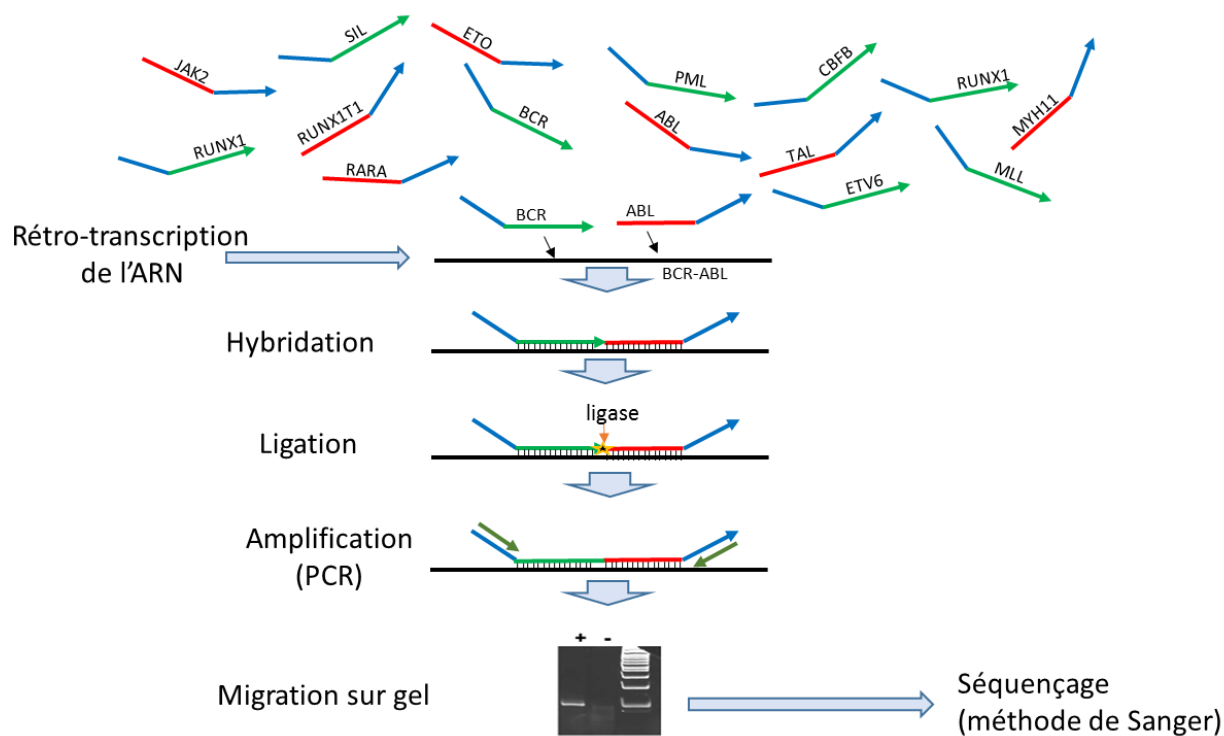


Figure 29 : Principe de la technique de LD-RT PCR (*ligation-dependent reverse-transcriptase PCR*)

Cette technique ne détecte que les gènes partenaires inclus dans le design, et doit donc être utilisée en complément d'une technique exhaustive, telle que la FISH. Cependant, elle permet de collecter des informations sur les gènes partenaires impliqués. Dans le cadre des LPDC, les réarrangements de *MYC* ne conduisent pas à des transcrits de fusion, et ne peuvent donc pas être détectés par cette technique. En revanche, les transcrits de fusion impliquant *MYB* sont potentiellement identifiables, et nous avons ainsi mis au point un tel essai, en collaboration avec l'UMR1245. Dans le design mis au point, nous pouvons détecter spécifiquement les réarrangements de *MYB*, mais aussi de son homologue *MYBL1*. Nous avons en effet souhaité inclure l'ensemble des 16 gènes reportés comme partenaires de *MYB* et de *MYBL1*, dans les LPDC, mais aussi dans d'autres tumeurs, telles que les carcinomes adénoïdes kystiques, les gliomes pédiatriques et les LA à basophiles^{233,235-237}, car ces gènes partenaires pourraient également être impliqués dans les réarrangements des LPDC. Des amorces correspondant au transcrit *NR3C1-LIN02021* ont également été incluses car ce transcrit est présent dans la lignée cellulaire GEN2.2¹³⁶, disponible au laboratoire. Au total, ce design correspond à 57 oligonucléotides (Figure 30). De plus, deux oligonucléotides permettent d'amplifier le gène *GAPDH* (exons 3 et 4) qui sert alors de contrôle de réaction attestant que l'ADN complémentaire est amplifiable, en quantité suffisante, et que les étapes d'hybridation, ligation et amplification ont bien fonctionné. Nous disposons également de contrôles positifs *NR3C1-LIN02021* (lignée GEN2.2), *MYB-PLEKHO1*, *MYB-ZFAT* et *MYB-DCPS* obtenus auprès de l'équipe du Pr. Y Okuno (Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japon), à l'origine de la description des réarrangements récurrents de *MYB* dans les LpDC¹⁰³.

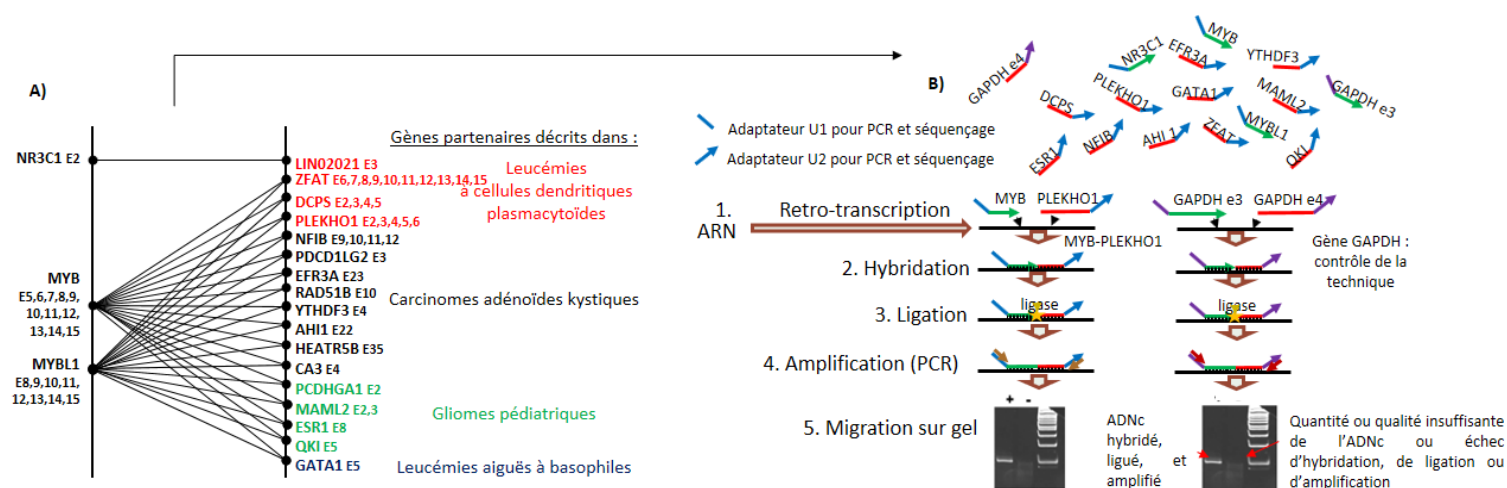


Figure 30 : Design LD-RT PCR *MYB*, *MYBL1* et *NR3C1*

A) Gènes cibles de l'essai : gènes leaders *MYB* et *MYBL1* et 16 gènes partenaires potentiels, ainsi que le couple *NR3C1-LIN02021*, soit 57 oligonucléotides au total, et 2 oligonucléotides contrôles correspondant aux exons 3 et 4 de *GAPDH*. B) Étapes techniques : 1. le mix d'oligonucléotides et l'ARN rétrotranscrit sont mis en contact. 2. les oligonucléotides s'hybrident sur leur séquence complémentaire de l'ADN complémentaire. 3. Ligation des oligonucléotides s'ils sont côte à côte, c'est-à-dire pour les exons 3 et 4 de *GAPDH*, et pour un transcrit de fusion, s'il existe. 4. Amplification par PCR des produits ligués. 5. Mise en évidence des produits obtenus par migration sur gel. En cas de produit détecté sur gel, ce produit sera séquencé.

II. Résultats

A. Article 1 : “Transcriptomic and genomic heterogeneity in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasms: from ontogeny to oncogenesis”

Résumé

Les profils d'expression génique des 12 LPDC ont été comparés à ceux de 164 LA (LAM, LAL-B, LAL-T). Les LPDC sont clairement individualisées des autres LA et sont plus proches des pDC physiologiques en analyse non supervisée, en analyse en composante principale et dans les analyses d'enrichissement des gènes (GSEA pour *Gene Set Enrichment Analysis*), avec un enrichissement en signatures pDC, lymphoïde B, AS-DC, ainsi que dans les voies de transport vésiculaire et de déubiquitinylation. Cet enrichissement en signatures lymphoïdes B se traduit également par une plus grande proximité avec les LAL-B qu'avec les LAL-T et LAM. Les autres LA sont bien distinctes des LPDC en analyse non supervisée, à l'exception d'un cas (patient P13), initialement diagnostiqué comme LAL-T, présentant un profil d'expression génique en tout point similaire aux 12 LPDC. Après recherche de marqueurs spécifiques des LPDC, il est apparu que ce patient présentait des caractéristiques phénotypiques et cytologiques compatibles avec un diagnostic de LPDC. Par conséquent, ce patient a été reclassé pour les analyses génétiques ultérieures.

Associé à ces signatures lymphoïdes B et AS-DC, le profil génétique des LPDC se caractérise par des pertes chromosomiques très fréquentes et variées dans les 13 cas étudiés, entraînant des délétions de gènes clés en onco-hématologie (*RB1*, *TP53*, *IKZF1*, *IKZF2*, *IKZF3*, *ETV6*, *NR3C1*), mais également de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (*IFNGR*, *TGFB*, *CLEC4C*, cluster des gènes *IFNA*). Certains de ces gènes clés en onco-hématologie sont également mutés, notamment des gènes classiquement retrouvés dans les hémopathies lymphoïdes tels qu'*IKZF1* (62%), *IKZF2/3*, *CDKN2A/B* et *ETV6*. Cependant, comme attendu, ces mutations sont associées à un profil mutationnel également myéloïde, avec des mutations impliquant des gènes de méthylation de l'ADN (*TET2* est le gène le plus fréquemment muté, 62% des cas), de modification de la chromatine (*ASXL1*, 46%), d'épissage (*ZRSR2*, 31%) et des voies de signalisation.

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence, certaines caractéristiques lymphoïdes B et d'AS-DC, mais au sein d'une hétérogénéité phénotypique, génétique et transcriptomique, avec parfois des difficultés diagnostiques, comme illustré avec le patient P13. Divers marqueurs génétique mais aussi phénotypiques évoquent soit une origine myéloïde, soit lymphoïde selon les échantillons, avec également des marqueurs AS-DCs. Cependant, ce profil AS-DC n'est pas retrouvé pour tous les échantillons et certaines anomalies génétiques qui rapprochent les LPDC des AS-DC, sont liées à la leucémogénèse et non à l'ontogénèse, telle que la délétion 9p entraînant une perte des gènes codant pour les IFN-I. Il est par conséquent difficile de conclure quant à une origine pDC ou AS-DC de la cellule tumorale, et il est possible que les LPDC soient hétérogènes, avec deux groupes d'origines cellulaires différentes.

Transcriptomic and genomic heterogeneity in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell

Neoplasms: from ontogeny to oncogenesis

Blood Advances, Accepted, December 30th, 2020

Short title for the running head: Molecular heterogeneity of Blastic pDC Neoplasms

Florian Renosi,¹ Anne Roggy,² Ambre Giguelay,³ Lou Soret,¹ Pierre-Julien Viailly,⁴ Meyling Cheok,⁵ Sabeha Biichle,¹ Fanny Angelot-Delettre,¹ Vahid Asnafi,⁶ Elizabeth Macintyre,⁶ Sandrine Geffroy,^{5,7} Mary Callanan,⁸ Tony Petrella,⁹ Eric Deconinck,^{1,10} Etienne Daguindau,^{1,10} Véronique Harrivel,¹¹ Sabrina Bouyer,¹² Véronique Salaun,¹³ Pascale Saussoy,¹⁴ Jean Feuillard,¹⁵ Pascal Fuseau,¹⁶ Philippe Saas,¹ Olivier Adotevi,¹ Fabrice Jardin,⁴ Christophe Ferrand,¹ Claude Preudhomme,^{5,8} Jacques Colinge,³ Christophe Roumier,^{5,8} Francine Garnache-Ottou^{1,2}

¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, Établissement Français du Sang Bourgogne/Franche-Comté, Unite Mixte de Recherche (UMR) 1098, RIGHT (Interactions Greffon-Hôte-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique), Besançon, France

²Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, laboratoire d'hématologie, Besançon, France

³INSERM U1194, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, France; Institut régional du Cancer Montpellier, Montpellier, France; Université de Montpellier, Montpellier, France

⁴INSERM U1245, Centre Henri Becquerel, Rouen, France

⁵Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France.

⁶INSERM U1151, Université de Paris, Institut Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hopitaux de Paris, France

⁷Laboratory of Hematology, CHU Lille, Lille, France

⁸Service d'Oncologie Génétique, Université Bourgogne-Franche Comté, INSERM 1231 and 1209, CHU Dijon Bourgogne, Dijon, France

⁹Department of Pathology, University of Montréal, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, QC, Canada

¹⁰Service d'Hématologie, CHU Besançon, Besançon, France;

¹¹Laboratoire d'Hématologie, CHU Hôpital Nord, Place Victor Pauchet, Amiens, France.

¹²Service d'Hématologie biologique, CHU La Milétrie, Poitiers, France.

¹³Laboratoire d'Hématologie, CHU de Caen Normandie, Normandie Université, UNICAEN, Caen, France.

¹⁴Cliniques Universitaires St-Luc, Bruxelles, Belgique.

¹⁵Laboratoire d'hématologie, CHU Dupuytren, Limoges, France

¹⁶Laboratoire d'hématologie, site P.Zobda Quitman, CHU de Martinique, Fort-de-France, Martinique, France

Corresponding Author:

Prof. Francine Garnache Ottou, UMR1098, Laboratoire Hématologie, EFS/B-FC, 8 rue Dr JFX Girod, 25020 Besançon, France. Phone: +33(0)3.81.615.615, Fax: +33(0)3.81.615.617, E-mail: francine.garnache@efs.sante.fr

ABSTRACT

Oncogenesis and ontogeny of Blastic Plasmacytoid Dendritic Cells Neoplasm (BPDCN) remain uncertain between canonical plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) and AXL⁺ SIGLEC6⁺ DCs (AS-DCs). We compared 12 BPDCN to 164 acute leukemia (AL) by Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 arrays: BPDCN were closer to B-ALL, with enrichment in pDC, B-cell signatures, vesicular transport, deubiquitination pathways and also AS-DC signatures but only in some cases. Importantly, one T-ALL clustered with BPDCN, with compatible morphology, immunophenotype (cCD3⁺ sCD3⁻ CD123⁺ cTCL1⁺ CD304⁺) and genetics. Many oncogenetic pathways are deregulated in BPDCN compared to normal pDC, such as cell cycle kinases, *GLUL* and *SOX4* involved in B and pDC ontogeny, and also in cancer cell invasion. High-throughput sequencing (HaloPlex) showed myeloid mutations (*TET2*, 62%; *ASXL1*, 46%; *ZRSR2*, 31%) associated in a very particular way to lymphoid mutations (*IKZF1*, 62%) while SNP-array (Affymetrix SNP-array 6.0) revealed frequent losses (mean: 9/patient) involving key hematological oncogenes (*RB1*, *IKZF1/2/3*, *ETV6*, *NR3C1*, *CDKN2A/B*, *TP53*) and immune response genes (*IFNGR*, *TGFB*, *CLEC4C*, *IFNA* cluster). Various markers suggest an AS-DC origin but not in all patients and some of these abnormalities are related to the leukemogenesis process, such as the 9p deletion leading to decreased expression of genes encoding type I interferons. In addition, the AS-DC profile is only found in a subgroup of patients. Overall, the cellular ontogenic origin of BPDCN needs still to be provided and these results highlight the heterogeneity of BPDCN with a risk of diagnostic trap.

MAIN TEXT

INTRODUCTION

Dendritic Cells (DCs) consist of conventional or myeloid DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). pDCs are Lineage⁻ CD4⁺ CD123^{high} HLA-DR^{high} and produce large amounts of IFN type I in response to viral infections¹. They would develop from myeloid and/or lymphoid progenitors. The myeloid branch includes Common Myeloid Progenitors (CMPs) and Common DC Progenitors (CDPs) with both cDC and pDC potential^{2,3} while the lymphoid branch involve Common Lymphoid Progenitor (CLPs).^{4–6} Recently, AXL⁺ SIGLEC6⁺ CD11c^{-low} DCs (AS-DCs) have been described among the CD123^{high} HLA-DR^{high} DCs.^{4,7} Single-cell RNA-sequencing shows that this population shares pDC and cDC-like enriched signatures. Characterized by a low IFN secretion and the ability to stimulate T-cell proliferation, they have properties closer to cDC and are considered as a transition state from pDC to cDC, explaining conflicting descriptions of pDCs.^{7,8} They express cDC markers such as CD2, CD33, CD5, CD86 but also pDC markers such as CD123^{high} and CD303⁷ and present some B-cell features: IGLL1⁺ SIGLEC1⁺ CD22⁺ LYZ⁺ compared to canonical pDCs.^{4,7,9–11}

Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN) is a rare and aggressive leukemia derived from pDCs, which is characterized by skin involvement and by affecting mainly elderly men.^{12–18} Our team previously described a BPDCN-specific transcriptomic profile leading to dysregulation of *LXR* target genes involved in cholesterol homeostasis.¹⁹ The mutational landscape of BPDCN is closed to myeloid malignancies impacting epigenetics (*TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *ATRX*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*), RAS pathway (*NRAS*, *KRAS*), splicing (*SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*), kinases signaling (*FLT3*, *KIT*), and tumor removal (*TP53*, *RB1*, *ATM*).^{20–27} Moreover, Chronic MyeloMonocytic Leukemia (CMML) can be associated with or followed by BPDCN^{28,29}, with a shared clonal origin^{30,31}. Moreover, secondary malignancies occurring with or after BPDCN are mostly myeloid neoplasms³², rarely lymphoid, and never with the demonstration of a common clonal origin, suggesting co-occurrence instead of a common origin^{33–35}. Conversely, deletions of *CDKN2A/CDKN2B* and *IKZF1* are particularly prevalent in BPDCN, similarly to lymphoid neoplasms, as well as *MYC* rearrangements, underlying similarities with high-grade B-cell lymphoma.^{25,36–38} Moreover, the CAL-1 cell line, derived from a BPDCN patient, is *MYC*-rearranged and exhibits an AS-DC profile with the following phenotype: AXL⁺ SIGLEC1⁺ IGLL1⁺ BCL11A⁺ ID2⁺ SPIB⁺ SPI1⁺ PAX5⁻ TCF3⁻ ID3⁻.^{4,37} Variability of lineage marker expression is also frequent in BPDCN, with expression of AS-DC markers such as CD22, CD2 or CD33.¹⁷ However, the exhaustive AS-DC phenotype has never been investigated in BPDCN patients. In addition, some other

lymphoid or myeloid lineage markers can be expressed such as CD7, cCD79a, CD117 and/or CD15, which do not correspond to the AS-DC phenotype.^{20,39–42}

Data obtained on BPDCN during the last years have not clarified whether BPDCN derive from canonical pDCs or from AS-DCs, or whether BPDCN can be divided in two groups: one derived from canonical pDC and the other from AS-DC. In this study, we clarified the transcriptomics signature of BPDCN in comparison with other Acute Leukemia (AL), and correlate it with Copy Number Variations (CNV) and mutations to investigate pathways involved in BPDCN oncogenesis and ontogeny.

METHODS

Patients and materials

Bone Marrow (BM) aspirates or Peripheral Blood (PB) samples were obtained for BPDCN diagnostic purposes from 12 patients (French BPDCN network, authorization number DC-2008-713) in comparison with a control cohort of 164 others acute leukemia (AL) including AML (n=79), B-ALL (n=24) and T-ALL (n=61) (Supplemental methods). All BPDCN patients had cutaneous involvement with diagnostic confirmation on skin biopsies for 10 of them (Table 1). This study was approved by the local ethics committee (CPP EST II, Besançon, France, January 31, 2017).

Molecular annotations

TCR δ and γ rearrangements and direct sequencing of *TCR* and *NOTCH1/FBXW7* genes were performed as previously described.⁴³ Internal Tandem Duplications and mutations of the Tyrosine Kinase Domain of *FLT3* (*FLT-ITD* and *FLT3-TKD*), as well as *CEBPa* mutations were centrally assessed on ABI 2720 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, NC, USA) with Sequencing Analysis v2.5 software.

Next-generation sequencing and bioinformatics analysis

Next Generation Sequencing (NGS) was performed from a HaloPlex^{HS} Target Enrichment System design for Illumina Sequencing (Agilent) targeting 68 genes (Supplemental Table 1) in paired-end, 2x150 cycles on aMiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Raw data were analyzed using an in-house bioinformatics pipeline (Supplemental Methods).⁴⁴ Sequencing by the Sanger method was performed on ABI PRISM 3500 DNA Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) with a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific).

Single Nucleotide Polymorphism Array analysis

Genome-wide detection of copy number variation (CNV) and copy-neutral loss of heterozygosity (CN-LOH) were performed using the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). CNV were identified and depicted with tools listed in Supplemental Methods.

Gene expression profiling and data analysis

Gene expression profiling (GEP) was obtained using Human Genome U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix) from 176 leukemia samples (12 BPDCN, 164 AL) (Microarray data are available at GEO under accession number GSExxx) compared to 5 normal cell-sorted cDCs and 5 pDCs from GEO database, GSE28490: GSM705321-25 and 29-33 respectively (See Supplementary Methods for analysis and Supplemental Table 2 for published signatures).

Statistics

Statistical analyses were performed using Prism software v6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), using non-parametric tests for quantitative variables with non-Gaussian distribution, Spearman correlation and Kruskal-Wallis tests when relevant. All statistical tests were two-sided, with 5% significance.

RESULTS

Patients

Eleven males and one woman diagnosed for BPDCN (median age 63.5 years old, sex ratio: M/F=11/1) had cutaneous lesions at diagnosis, and a characteristic phenotype of BPDCN on PB or BM (BPDCN score>3)⁴⁰ with high expression of CD123, HLA-DR and cTCL1, expression of CD4, CD56, CD304 and/or CD303, without expression of CD34, or strong lineage commitment markers such as MPO, cCD3, cCD79a, CD14 and CD11c. The blastic population also expressed T-cell markers in 7 cases (CD2, CD5 and/or CD7), myeloid markers in 6 patients (CD33 and/or CD117) and one case expressed the B-cell marker CD22 (Table 1).

A T-ALL reclassified as BPDCN

Upon unsupervised analysis, the 12 BPDCN samples all clustered together, close to normal pDCs and cDCs and apart from other AL. Patient P13, initially diagnosed with T-ALL also clustered with BPDCN patients (Figure 1A). The diagnosis was thus reconsidered for this 46-year-old woman exhibiting cCD3 positive blasts (75%, medium intensity), without expression of surface CD3. According to TCR classification of T-ALL, this case was initially designated as immature IM0 T-ALL, with cTCR β^- and germline TCR δ, γ, β . Tumor cells expressed CD4 and CD2, low level of TdT and CD10, and no CD5 or CD7 expression. Considering our transcriptomic results, pDC markers were evaluated in a second step: despite no expression of CD303 and CD56, CD304 was partially expressed (34%) and CD123 and cTCL1 were expressed at high levels (Table 1, Figure 1B). Morphologically, medullar blasts were characterized by regular nuclei and small nucleoli, no cytoplasmic granulation, small vacuoles and pseudopodia in some cells (Figure 1C). The BPDCN score was only 2, because of cCD3 positivity, but blasts expressed high level of CD123, and one of the most specific BPDCN markers, cTCL1. In addition, genetic and cytogenetic aberrations found in this patient were similar to the 12 other BPDCN cases, as described below. Taken together, these results led us to retrospectively classify patient P13 as a BPDCN for further analyses.

Transcriptomic signature of BPDCN

A signature of 824 probe sets differentiating BPDCN from other AL was established (Supplemental Table 3). Genes associated with pDC lineage were particularly overexpressed in the 13 BPDCN cases, such as *LAMP5* (BADLAMP), *HES6*, *LILRB4* (ILT3), *LILRA4* (ILT7), *IL3RA* (CD123) and *CLEC4C* (CD303), *GLUL*, *IRF7*, *TLR7* and HLA class II genes, compared to AML, T-ALL or B-ALL (Supplemental Table 3). Some pDC

and B-cell markers, such as *TCL1A*, *TCF4*, *IGLL1*, *LRMP* and *NPC1*, displayed expression levels similar to B-ALL in BPDCN, arguing for a B lymphoid origin (Supplemental Figure 1). Furthermore, some AS-DC markers as *SIGLEC6* were more expressed in five cases including the CD22⁺ patient P4 (Figure 2A). Interestingly, a group of five cases was isolated (Supplemental Figure 2A) using signatures of AS-DCs,⁷ as well as other signatures: CD5⁺ CD81⁺ pDCs,¹¹ pDC commitment,⁶ activated *versus* resting pDCs, but also myeloid *versus* lymphoid lineage²⁶ and hematopoietic progenitors with B-lymphoid potential (hematopoietic stem cells, MLP and Pro-B).⁴⁶ These cases were not split with CMP, granulocyte-monocyte progenitors (GMP), megakaryocytic-erythroid progenitors and earliest thymic progenitors signatures.⁴⁶ Collectively, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) also confirmed that BPDCN were enriched in gene sets upregulated in canonical pDCs as well as AS-DCs signatures compared to other leukemias, but also in gene sets involved in protein misfolding, protein transport from the endoplasmic reticulum to the membrane, and in inflammatory response to antigenic stimuli (Supplemental Table 4).

Next, we compared BPDCN to each type of AL, beginning with AML. We applied the signature of Dijkman *et al*²¹, which clearly validated the same discrimination between BPDCN and AML on our cohort (Supplemental Figure 2B). Immune and inflammatory responses, cytokine-mediated signaling pathway appeared upregulated in AML compared to BPDCN, as well as cell adhesion and proliferation (Figure 2B). BPDCN always appeared enriched in pDC gene sets and endoplasmic reticulum genes, but also in deubiquitination process by GSEA (Supplemental Table 5, Figure 2C). When BPDCN were compared to ALL by GSEA, much more pathways were found regulated, notably vesicle trafficking pathways and B-cell genes were upregulated in BPDCN, consistent with the B-cell gene enrichment mentioned above (Supplemental Table 4, Figure 2D). Interestingly, BPDCN would also be enriched in NF- κ B pathway, RUNX targets, corticosteroid pathways and *KMT2A* rearrangements by GSEA. Pathways involved in inflammatory or adaptive immune response and in cell organization or signal transduction were downregulated in T-ALL compared to BPDCN (Figure 2B). Finally, when compared to B-ALL, hypergeometric tests reveal any pathway significantly different and GSEA was also less informative (Figure 2B, Supplemental Table S4).

The transcriptional signature of BPDCN is clearly different from pDC signature

As expected, BPDCN transcriptomes were enriched in pDC genes, but differential gene expression analysis revealed a much larger number of microarray probes (1,228) that were regulated when comparing the 13 BPDCN with the five normal pDC (Supplemental Table 3). BPDCN were clearly different from pDCs applying published signatures (Figures 2E,F).^{7,26} Genes differentially expressed between normal pDC and BPDCN allowed to identify oncogenesis pathways in BPDCN. As expected, cell proliferation and division were upregulated in BPDCN whereas regulation of cell shape and signal transduction was downregulated in BPDCN, as well as signal transduction (Figure 2B).

The top upregulated genes in BPDCN compared to normal pDC included *IGLL1*, *GLUL*, *CLEC11A*, *UBE2T*, *BCL6*, *TLR2*, *UBE2C*, *BCL2*, *LRMP*, *UBE2S* and *SOX4* (Figure 2G, Supplemental Table 3). By contrast, the most relevant genes downregulated in BPDCN compared to normal pDC were *GZMB*, *CLEC4C*, *NPC1*, *BCL11A*, *NPC2*, genes regulating the immune system (*IL10RA*, *CXCR3*), or ubiquitination (*UBE2W*, *UBE3C*) (Figure 2G).

BPDCN exhibit many mutations and chromosomal imbalances

The NGS panel was informative for all cases, with a number of detected mutations ranging from 1 to 7 (median 3). Twenty genes were found to be mutated among the 68 of the panel (Fig. 3A, Table S5). Epigenetic modifiers were particularly mutated, affecting DNA methylation with *TET2* (8/13, 62%), *IDH2* (1/13, 8%) or chromatin remodeling with *ASXL1* (6/13, 46% including 3 c.1934dupG confirmed by Sanger sequencing), *ARID1A* (1/13, 8%) and *BCOR* (1/13, 8%). Other mutations concern splicing factors *ZRSR2* (4/13, 31%), *SRSF2* (2/13, 15%); tumor suppressor genes *TP53* (2/13, 15%), *ATM* (2/13, 15%); transcription factors *ETV6* (1/13, 8%), *IKZF1* (2/13, 15%), *IKZF3* (1/13, 8%), *ZEB2* (1/13, 8%); RAS pathway *NRAS* (1/13, 8%), *KRAS* (1/13, 8%) or cytokine signaling pathway *JAK2* (2/13, 15%), *STAT3* (1/13, 8%), *CXCR4* (1/13, 8%) *NOTCH2* (1/13, 8%) and *MET* (1/13, 8%) (Figure 3A, Supplemental Table 5).

BPDCN patients also carried many abnormalities in SNP array analysis with a total of 117 chromosomal imbalances for the 13 BPDCN patients and a median of 9 aberrations per patient (range 2 to 19) (Figure 3B, Supplemental Table 6). Deletions (n=97) are more frequent than gains (n=20). The patient P13 carried 10 chromosomal losses and 2 chromosomal gains, in agreement with its requalification as BPDCN.

Notably, the minimal common deletion region (MCDR) on 7p arm found in 8 patients (61%) include the *IKZF1* locus. Moreover, no del(7p) were identified in patients P9 and P89, but stop gain mutations of *IKZF1* (p.E29X and p.Q1429X respectively) were detected by NGS (Figure 3A, Supplemental Table 5). The MCDR

12p13.1-2 includes *ETV6*, *CDKN1B* and *LRP6* genes (62% of patients). A ninth patient was mutated for *ETV6* with a stop gain p.Q267X (P4) leading to a total of 69% of patients with *ETV6* dysregulation. The MCDR 13q14.1-13q14.3 including *RB1* and *INTS6* was lost in 10 patients (78%) while a 9p21.3 MCDR was found in 5 patients (38%), with loss of *CDKN2A/CDKN2B* and *IFN* genes. The 9q21.32-21.33 region was also deleted in 6 patients (P1 2, 4, 5, 8, 18) (46%), notably including the Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase *NTRK2*. The sensitivity of SNP-array was assessed by 5q31.3 deletions, including *NR3C1*, previously searched for the 12 initially diagnosed BPDCN⁴⁷ and confirmed here by SNP-array. The 15q24.1-15q25.3 MCDR is detected in 4 patients, including *NTRK3* (31%). Three patients (P1, 3, 4) had a 6q23.3 deletion (23%), located next to *MYB*, allowing to suspect a rearrangement of this gene, known to be involved in recurrent transcript fusion in BPDCN²³. Similarly, a del(8q24) downstream to *MYC* was detected in patient P2. Expression data were also in favor of a *MYC* rearrangement, with an overexpression of *MYC* in 2 cases (P2 and P6) compared to other patients (Fig. 3C). Two del(17p) were detected in patients P8 and P11, involving the *TP53* locus 17p13.1. One of them (P8) was also *TP53*-mutated leading to a biallelic invalidation of the gene (Table S5). Patient P5 was also mutated for *TP53*, with a Variant Allele Frequency (VAF) of 98.25%, evocating a loss of heterozygosity (LOH), as no deletion were evidenced. Three patients presented homozygous deletions: in 9p21.3 for patient P1, and in 12p13.2 to p12.3 for patients P2 and P3. A total of 70 genes are included in these deleted regions (Table S7), including genes of interferon (*IFNA1*, 2, 4 to 8, 10, 14, 16, 17, 21, *IFNB1*) and proteins of cholesterol metabolism such as low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6 (*LRP6*).

Impact of chromosomal imbalances on transcriptional expression

When selecting the most relevant 354 genes whose expression is potentially impacted by copy number variation (Table S8), IPA revealed that the most frequently implicated pathways were infectious disease (24 impaired molecules: 5 gains and 19 losses), cell cycle (41 molecules: 33 loss and 8 gains), developmental disorder (23 molecules: 19 losses and 4 gains) and hematological disease (20 molecules: 14 losses and 6 gains) (Supplemental Fig. 3, Table 8-9). Cellular assembly, organization, function development were particularly impacted, notably molecular transport, cell-to-cell signaling and cell cycle, as well as genes implicated in immune response with deletions and downregulation of *IFNGR1* (interferon gamma receptor 1), *TGFB1*, *TNFRSF1A* (TNF receptor superfamily member 1A), *TNFAIP3* (TNF alpha-induced protein 3), *IFI6* (Interferon, alpha-inducible protein 6), members of the C-type lectin domain family *CLEC2B*, *CLEC4E* and *CLEC4C*, which were lost in some cases. The cluster A of HOX family genes (7p15) and genes of

ubiquitination (*USP42*, *UBQLN1*, *USPL1*, *CUL4A*, *USP12*) were also recurrently deleted and downregulated, while *UBE2H* was upregulated and gained in 3 patients. Among upregulated genes, *GLUL*, *FCER1A* and *APP* were also gained in 2 or 3 patients. Moreover, *ETV6* was invalidated in most of the patients (9/13) leading to lower expression than in AML and T-ALL. Interestingly, a part of B-ALL expressed *ETV6* at the same level as BPDCN, and these B-ALL also highly expressed *TCL1A* similarly to BPDCN (Fig. 3D).

DISCUSSION

Oncogenesis of BPDCN is still debated even if growing data have been obtained last few years.^{19,23,26,37,47–49} Our study highlight that many oncogenetic processes are activated in BPDCN compared to normal pDCs: cell proliferation and division are upregulated, notably G1/S transition of mitotic cell cycle. Cell cycle kinases such as *CDKN1B*, *CDKN2A* and *CDKN2B* are frequently deleted (69%) while *GLUL*, involved in cell proliferation, apoptosis inhibition and response to glucocorticoids in ALL,⁵⁰ is upregulated in our cohort of 13 cases compared to pDCs and gained in 3 patients by SNP-array. Interestingly, *SOX4* is upregulated in BPDCN compared to pDCs. *SOX4* is a transcription factor critical for lymphoid and pDC differentiation⁵¹ since it upregulates *TCF4*,⁵² a E-box transcription factor known to promote pDC lineage commitment^{49,53,54} whereas its deletion induce trans-differentiation into cDC cells.⁵⁵ *SOX4* is also expressed in a wide variety of human cancers, promoting migration, invasion and resistance to apoptosis.⁵⁶ In hepatocellular carcinoma, cell migration particularly depends of the *SOX4* target *NRP1*, also known as CD304 that is expressed by BPDCN⁵⁶ and *SOX4* plays a key role in AML leukemogenesis, constituting an independent poor prognostic factor.^{51,57} Since *SOX4* targets *TCF4* and *NRP1* appear crucial for BPDCN, its upregulation may represent a major element of BPDCN oncogenesis.

Furthermore, 3 cancer-related genes are particularly deleted or mutated: *ETV6* (69%), *RB1* (69%) and *IKZF1* (62%) each of them being crucial for BPDCN.^{25,30,38,58} In 2 patients, *ETV6* deletions are biallelic, evoking an early event, as already suggested⁵⁸ and leading to lower expression of *ETV6* than in AML and T-ALL. We found that *ETV6* and *TCL1A* expression are inversely correlated (Spearman, $r=-0.2197[-0.3600;-0.0698]$, $p=0.0034$). Especially, *TCL1A* is only overexpressed in cases with low *ETV6* expression, corresponding to our BPDCN cases and a subgroup of B-ALL (Kruskal-Wallis, $p<0.0001$), suggesting a link between *ETV6* downregulation and *TCL1A* upregulation. Interestingly, Fears *et al*⁵⁹ showed a reverse relationship in B-ALL with high *ETV6* level associated with decreased endogenous *TCL1A* expression. Our results highlight an original mechanism of *TCL1A* deregulation in BPDCN, different from aggressive B-cell

lymphoma^{60,61} and from T-cell prolymphocytic leukemia with chromosomal translocation that brings *TCL1A* (14q32.13) under *TCR* enhancer elements.

In addition, *NTRK* genes were deleted in 9 out of 13 patients (69%) (1 *NTRK1*, 4 *NTRK2*, 3 *NTRK3* and 1 *NTRK2+NTRK3*). Their overexpression and activating mutations are widely described in solid tumors, as well as fusion transcripts, including *ETV6-NTRK3* in rare cases of ALL or AML.⁶² Conversely, loss-of-function mutations are rarer without clear role in tumorigenesis.⁶² Similarly, the impact of such deletions is unknown in BPDCN.

Regulation of cell shape, adhesion and migration are also impacted in BPDCN. Especially, *HOXA* cluster is recurrently deleted, with *HOXA9* having an important regulatory role in cytokine induction of endothelium adhesion molecules, ELAM and VCAM-1.⁶³ In addition to the role of the *SOX4-NRP1* axis in migration, this deletion could also contribute to BM-to-skin or skin-to-BM cell spreading, as they have protumoral effects, promoting the metastatic process of solid tumors.^{64–66} *HOXA9* and *SOX4* deregulation may occur in a second time, after BM early oncogenic event, such as the *ETV6* deletions, previously suggested.⁵⁸

Our study clearly shows high expression of pDC-related genes consistent with their pDCs origin, and confirms activation of the NF- κ B and corticosteroid pathways.^{19,21,26,47} Although BPDCN have been previously related to resting pDCs,²⁶ a large majority of cases overexpress *BCL2* and are CD56⁺, 2 markers expressed in activated pDCs, notably in response to flt3L-mediated maturation.^{67,68} Moreover, *TLR2* is physiologically expressed after stimulation of pDCs⁶⁹ and much more expressed in BPDCN compared to normal pDCs. Another key point is the role of pDCs in the immune system, impacted in BPDCN, notably IFN regulation (*IFNGR1*, *IFI6*) and pathogen recognition with the CLEC family including the specific pDC marker *CLEC4C* (CD303). The latter is known to be negative or low in 25-30% of BPDCN cases.^{17,40}

As discussed above, the contribution of the myeloid and lymphoid branch of pDC genesis is still under debate. *SIGLEC6*, suggestive of the AS-DC cell subtype appeared here upregulated in 5 cases, as already shown in some literature^{4,7} and could support a AS-DC origin of these cases, as hypothesized for the CAL-1 cell line.⁴ These results appear sample-dependent, as already described with some primary neoplastic cells able to secrete IFN type I and other not, evoking an AS-DC cell-of-origin.¹³ This heterogeneity may suggest that BPDCN would have a heterogeneous ontogeny, with some of them being derived from canonical pDCs (7 to 8 cases in our cohort depending on signatures used) and others from AS-DCs (5 to 6 cases). As a

consequence of a myeloid or lymphoid origin of BPDCN, this heterogeneity could induce variable expression of CD33, CD22, CD2 or CD7 expression as found in our 13 cases and in our larger cohorts of BPDCN.^{39,41} However, some AS-DC characteristics could also be explained by the oncogenic process, such as low IFN secretion in BPDCN compared to normal pDCs, which can be attributed to recurrent deletions of IFN genes, or CD2 expression upregulated by SOX4.⁷⁰

The mutational landscape of BPDCN is considered to be myeloid-like (*TET2*, *ASXL1*, *ZRSR2*, *SRSF2*, *BCOR*, *JAK2*) and case reports of CMML evolving to BPDCN,^{29–31} suggest that at least a part of BPDCN may originate from a CMP. Conversely, a lymphoid-like origin of BPDCN is supported by the overexpression of *IGLL1*, *LRMP*, *BCL11A*, *BCL2* and genes involved in lymphoid proliferation such as *BCL6*, *IKZF1*, *ETV6* and *MYC*. Of note, *IKZF1* abnormalities are highly prevalent in BPDCN but absent in myeloid neoplasms, except for rare cases in the very particular context of pediatric AML.⁷¹ In fact, the myeloid-like profile of BPDCN mainly concern preleukemic mutations and not transforming event, similarly to AML and MDS arising from Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP).^{72,73} In elderly patients with CHIP, epigenetic abnormalities (*TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1* mutations) typically appear at low VAF (usually <20%), constituting a strong risk factor for subsequent hematological neoplasm (hazard ratio>10).^{72,73} At the diagnosis of neoplasm, VAF reach higher levels, due to clonal evolution. Similarly, patients are actually elderly in BPDCN and exhibit frequent *TET2* or *ASXL1* mutations (85% of our cases). This early epigenetic event would be followed by non-myeloid oncogenic events including canonical lymphoid abnormalities (69% of cases with *IKZF1/2/3* or *CDKN2A/B* invalidation, plus *ATM*, *MYC*, *STAT3*) and pan-cancer mutations (*NRAS*, *KRAS*, *TP53*) in the pDC lineage or in cells where the pDC/AS-DC commitment would be promoted by TCF4 upregulation via SOX4 deregulation.

BPDCN displays immunophenotype heterogeneity and misclassification risks. We illustrate this challenge, with patient P13. Despite an absence of expression of CD56 and CD303, and cytoplasmic expression of CD3, conceptually negative in BPDCN (but already described positive intracellularly in BPDCN⁷⁴), a strong commitment to the pDC lineage was evidenced with gene expression profile, chromosomal imbalances and positivity of the following markers: CD4, CD123, CD304 and cTCL1. This patient leads us to perform a BPDCN differential diagnosis in case of immature AL of uncertain lineage (cCD3⁺ sCD3⁻ CD7⁻, without TCR γ and TCR δ rearrangement) when only one marker points to T-ALL or AML diagnosis and *a fortiori* if skin manifestations are detected. Specific markers for differential diagnosis should

be used in such circumstances by flow cytometry or immunohistochemistry such as TCL1, CD123, CD303, RUNX2, HES6 and TCF4.^{21,53,75}

In conclusion, the more we learn about pDC ontogeny, the more BPDCN oncogenesis seems complex with a high variety of oncogenic mechanisms involved. Developing advanced strategies for diagnosis remains crucial, with mandatory specific markers. We also need to evaluate the clinical and prognostic impact of this heterogeneity in largest cohorts, and the specific deregulated pathways mentioned above should encourage the development of specific targeted therapies in BPDCN.

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by La Ligue contre le Cancer 2008, Fondation ARC (Aides Individuelles DOC20170505805), Institut National de Cancer Translational Research program (DM/FC/sl/RT07) and Association Laurette Fugain (ALF 2018/08). The authors would like to thank Fiona Ecarnot for English proofreading. We would like to thank the Laboratory of immunology (Pr E. Seilles) the laboratory of Cytology (Dr F. Schillinger), the French BPDCN network, the *Groupe Français d'hématologie cellulaire* (GFHC), the *Groupe d'étude immunologique des leucémies* (GEIL), the *Groupe Français de cytogénétique hématologique* (GFCH) and the *Société Française d'hématologie* (SFH).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FGO, CR, EM and VA concept the project; FGO, EM and CR supervised the research. CR, AR, FR, LS, SB, FA, CF performed experiments. FR, MC, CR, AG, PJV, FJ performed bioinformatic analyses. CR, FGO, EM, VA, CP were responsible for patient samples. TP provided help with immunohistochemistry and anatomopathology analysis. FR, AR, FGO, CR wrote the manuscript and CP, EM, VA, PS, CF, OA, MC, FJ, JC commented on the manuscript. All authors provided input, edited and approved the final version of the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT: DNA sequencing and transcriptomic datasets will be deposited to public repositories upon acceptance of this manuscript.

DISCLOSURE OF CONFLICT OF INTEREST: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Gilliet M, Cao W, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(8):594-606. doi:10.1038/nri2358
2. Naik SH, Sathe P, Park H-Y, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol*. 2007;8(11):1217-1226. doi:10.1038/ni1522
3. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol*. 2007;8(11):1207-1216. doi:10.1038/ni1518
4. Dekker JD, Rhee C, Hu Z, et al. Lymphoid origin of a lineage of intrinsically activated plasmacytoid dendritic cell in mice and humans. *bioRxiv*. Published online April 30, 2018:310680. doi:10.1101/310680
5. Dress RJ, Dutertre C-A, Giladi A, et al. Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D+ lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage. *Nat Immunol*. 2019;20(7):852-864. doi:10.1038/s41590-019-0420-3
6. Rodrigues PF, Alberti-Servera L, Eremin A, Grajales-Reyes GE, Ivanek R, Tussiwand R. Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol*. 2018;19(7):711-722. doi:10.1038/s41590-018-0136-9
7. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017;356(6335). doi:10.1126/science.aah4573
8. See P, Dutertre C-A, Chen J, et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science*. 2017;356(6342). doi:10.1126/science.aag3009
9. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;182(11):6815-6823. doi:10.4049/jimmunol.0802008
10. Alcántara-Hernández M, Leylek R, Wagar LE, et al. High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity*. 2017;47(6):1037-1050.e6. doi:10.1016/j.immuni.2017.11.001
11. Zhang H, Gregorio JD, Iwahori T, et al. A distinct subset of plasmacytoid dendritic cells induces activation and differentiation of B and T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(8):1988-1993. doi:10.1073/pnas.1610630114
12. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Vol 2. Revised 4th Edition. International Agency for Research on Cancer; 2017.
13. Chaperot L, Bendriss N, Manches O, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2001;97(10):3210-3217.
14. 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.
15. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Vol 2. Revised 4th Edition. International Agency for Research on Cancer; 2017.

16. Julia F, Petrella T, Beylot-Barry M, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: clinical features in 90 patients. *Br J Dermatol*. 2013;169(3):579-586. doi:10.1111/bjd.12412
17. Garnache-Ottou F, Vidal C, Biichlé S, et al. How should we diagnose and treat blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients? *Blood Adv*. 2019;3(24):4238-4251. doi:10.1182/bloodadvances.2019000647
18. Lúcio P, Parreira A, Orfao A. CD123hi dendritic cell lymphoma: an unusual case of non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med*. 1999;131(7):549-550.
19. Ceroi A, Masson D, Roggy A, et al. LXR agonist treatment of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm restores cholesterol efflux and triggers apoptosis. *Blood*. 2016;128(23):2694-2707. doi:10.1182/blood-2016-06-724807
20. 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. doi:10.1002/ajh.23567
21. Dijkman R, van Doorn R, Szuhai 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. doi:10.1182/blood-2006-04-018143
22. 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. doi:10.1038/leu.2013.283
23. Suzuki K, Suzuki Y, Hama A, et al. Recurrent MYB rearrangement in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Leukemia*. 2017;31(7):1629-1633. doi:10.1038/leu.2017.101
24. 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+ haematodermic neoplasms and contribute to the aggressiveness of the disease. *Leukemia*. 2009;23(4):698-707. doi:10.1038/leu.2008.359
25. Lucioni M, Novara F, Fiandrino G, et al. Twenty-one cases of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: focus on biallelic locus 9p21.3 deletion. *Blood*. 2011;118(17):4591-4594. doi:10.1182/blood-2011-03-337501
26. Sapienza MR, Fuligni F, Agostinelli C, et al. 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. doi:10.1038/leu.2014.64
27. Stenzinger A, Endris V, Pfarr N, et al. Targeted ultra-deep sequencing reveals recurrent and mutually exclusive mutations of cancer genes in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Oncotarget*. 2014;5(15):6404-6413. doi:10.18632/oncotarget.2223
28. Hu Z, Sun T. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm associated with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2016;128(12):1664-1664. doi:10.1182/blood-2016-06-723536
29. Lebecque B, Vial J-P, Pigneux A, Lechevalier N. Chronic myelomonocytic leukaemia followed by blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Br J Haematol*. 2019;185(3):398. doi:10.1111/bjh.15794
30. Patnaik MM, Lasho T, Howard M, et al. Biallelic inactivation of the retinoblastoma gene results in transformation of chronic myelomonocytic leukemia to a blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm:

shared clonal origins of two aggressive neoplasms. *Blood Cancer J.* 2018;8(9):82. doi:10.1038/s41408-018-0120-5

31. Brunetti L, Di Battista V, Venanzi A, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm and chronic myelomonocytic leukemia: a shared clonal origin. *Leukemia.* 2017;31(5):1238-1240. doi:10.1038/leu.2017.38
32. Ramachandran V, Park KE, Loya A, Duvic M. Second primary malignancies in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a national database study. *J Am Acad Dermatol.* Published online April 9, 2020. doi:10.1016/j.jaad.2020.03.101
33. Milley S, Thomas L, Balme B, Dalle S. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm following Waldenström macroglobulinemia. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2016;30(5):904-905. doi:10.1111/jdv.13074
34. Khan AM, Munir A, Raval M, Mehdi S. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in the background of myeloproliferative disorder and chronic lymphocytic leukaemia. *BMJ Case Rep.* 2019;12(7). doi:10.1136/bcr-2019-230332
35. Harvell JD, Fulton R, Jones CD, Terris DJ, Warnke RA. Composite dendritic cell neoplasm (NOS) and small lymphocytic lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2000;8(4):322-328.
36. Zachariadis V, Schoumans J, Barbany G, et al. Homozygous deletions of CDKN2A are present in all dic(9;20)(p13.2;q11.2)-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias and may be important for leukaemic transformation. *Br J Haematol.* 2012;159(4):488-491. doi:10.1111/bjh.12051
37. Sakamoto K, Katayama R, Asaka R, et al. Recurrent 8q24 rearrangement in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: association with immunoblastoid cytomorphology, MYC expression, and drug response. *Leukemia.* 2018;32(12):2590-2603. doi:10.1038/s41375-018-0154-5
38. Bastidas Torres AN, Cats D, Mei H, et al. Whole-genome analysis uncovers recurrent IKZF1 inactivation and aberrant cell adhesion in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Genes Chromosomes Cancer.* 2020;59(5):295-308. doi:10.1002/gcc.22831
39. Garnache-Ottou F, Chaperot L, Biichle S, et al. Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2005;105(3):1256-1264. doi:10.1182/blood-2004-06-2416
40. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, et al. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia. *Br J Haematol.* 2009;145(5):624-636. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07679.x
41. Garnache-Ottou F, Vidal C, Biichle S, et al. How should we diagnose and treat Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN) Patients? *Blood Adv.* 2019;In Press.
42. Poret E, Angelot-Delettre F, Biichle S, et al. Biological Description of 109 Cases of Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN) from the French Network of BPDCN. Presented at the: 57th Annual Meeting Exposition of American Society of Hematology; December 7, 2015; Orlando.
43. Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, et al. Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. *Blood.* 2003;101(7):2693-2703. doi:10.1182/blood-2002-08-2438
44. Viallly PJ, Mareschal S, Bertrand P, et al. GenerateReports : an IonTorrent plugin summarizing a whole NGS experiment for clinical interpretation. *23rd Annual International Conference on Intelligent*

45. Defays A, David A, de Gassart A, et al. BAD-LAMP is a novel biomarker of nonactivated human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2011;118(3):609-617. doi:10.1182/blood-2010-11-319699
46. Laurenti E, Doulatov S, Zandi S, et al. The transcriptional architecture of early human hematopoiesis identifies multilevel control of lymphoid commitment. *Nat Immunol*. 2013;14(7):756-763. doi:10.1038/ni.2615
47. Emadali A, Hoghoughi N, Duley S, et al. Haploinsufficiency for NR3C1, the gene encoding the glucocorticoid receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms. *Blood*. 2016;127(24):3040-3053. doi:10.1182/blood-2015-09-671040
48. Sapienza MR, Abate F, Melle F, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: genomics mark epigenetic dysregulation as a primary therapeutic target. *Haematologica*. 2019;104(4):729-737. doi:10.3324/haematol.2018.202093
49. Ceribelli M, Hou ZE, Kelly PN, et al. A Druggable TCF4- and BRD4-Dependent Transcriptional Network Sustains Malignancy in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. *Cancer Cell*. 2016;30(5):764-778. doi:10.1016/j.ccell.2016.10.002
50. Dyczynski M, Vesterlund M, Björklund A-C, et al. Metabolic reprogramming of acute lymphoblastic leukemia cells in response to glucocorticoid treatment. *Cell Death Dis*. 2018;9(9):846. doi:10.1038/s41419-018-0625-7
51. Aue G, Du Y, Cleveland SM, et al. Sox4 cooperates with PU.1 haploinsufficiency in murine myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(17):4674-4681. doi:10.1182/blood-2011-04-351528
52. Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T. Sox4 functions as a positive regulator of β -catenin signaling through upregulation of TCF4 during morular differentiation of endometrial carcinomas. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2012;92(4):511-521. doi:10.1038/labinvest.2011.196
53. Sukswai N, Aung PP, Yin CC, et al. Dual Expression of TCF4 and CD123 is Highly Sensitive and Specific For Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. *Am J Surg Pathol*. Published online June 28, 2019. doi:10.1097/PAS.0000000000001316
54. Cisse B, Caton ML, Lehner M, et al. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell*. 2008;135(1):37-48. doi:10.1016/j.cell.2008.09.016
55. Ghosh HS, Cisse B, Bunin A, Lewis KL, Reizis B. Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2010;33(6):905-916. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.023
56. Liao Y-L, Sun Y-M, Chau G-Y, et al. Identification of SOX4 target genes using phylogenetic footprinting-based prediction from expression microarrays suggests that overexpression of SOX4 potentiates metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2008;27(42):5578-5589. doi:10.1038/onc.2008.168
57. Lu J-W, Hsieh M-S, Hou H-A, Chen C-Y, Tien H-F, Lin L-I. Overexpression of SOX4 correlates with poor prognosis of acute myeloid leukemia and is leukemogenic in zebrafish. *Blood Cancer J*. 2017;7(8):e593. doi:10.1038/bcj.2017.74

58. Tang Z, Li Y, Wang W, et al. Genomic aberrations involving 12p/ETV6 are highly prevalent in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms and might represent early clonal events. *Leuk Res*. 2018;73:86-94. doi:10.1016/j.leukres.2018.09.006
59. Fears S, Chakrabarti SR, Nucifora G, Rowley JD. Differential expression of TCL1 during pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia progression. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;135(2):110-119.
60. Aggarwal M, Villuendas R, Gomez G, et al. TCL1A expression delineates biological and clinical variability in B-cell lymphoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2009;22(2):206-215. doi:10.1038/modpathol.2008.148
61. Ramuz O, Bouabdallah R, Devilard E, et al. Identification of TCL1A as an immunohistochemical marker of adverse outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Int J Oncol*. 2005;26(1):151-157.
62. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(12):731-747. doi:10.1038/s41571-018-0113-0
63. Bandyopadhyay S, Harris DP, Adams GN, et al. HOXA9 Methylation by PRMT5 Is Essential for Endothelial Cell Expression of Leukocyte Adhesion Molecules. *Mol Cell Biol*. 2012;32(7):1202-1213. doi:10.1128/MCB.05977-11
64. Schlesinger M, Bendas G. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *Int J Cancer*. 2015;136(11):2504-2514. doi:10.1002/ijc.28927
65. Sharma R, Sharma R, Khaket TP, Dutta C, Chakraborty B, Mukherjee TK. Breast cancer metastasis: Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1. *Cell Oncol Dordr*. 2017;40(3):199-208. doi:10.1007/s13402-017-0324-x
66. Schadendorf D, Heide J, Gawlik C, Suter L, Czarnetzki BM. Association With Clinical Outcome of Expression of VLA-4 in Primary Cutaneous Malignant Melanoma as Well as P-selection and E-selectin on Intratumoral Vessels. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1995;87(5):366-371. doi:10.1093/jnci/87.5.366
67. Comeau MR, Van der Vuurst de Vries A-R, Maliszewski CR, Galibert L. CD123bright plasmacytoid predendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion? *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;169(1):75-83.
68. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002;100(13):4512-4520. doi:10.1182/blood-2001-11-0097
69. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194(6):863-869.
70. Wotton D, Lake RA, Farr CJ, Owen MJ. The high mobility group transcription factor, SOX4, transactivates the human CD2 enhancer. *J Biol Chem*. 1995;270(13):7515-7522. doi:10.1074/jbc.270.13.7515
71. de Rooij JDE, Beuling E, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Recurrent deletions of IKZF1 in pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2015;100(9):1151-1159. doi:10.3324/haematol.2015.124321
72. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-2498. doi:10.1056/NEJMoa1408617
73. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477-2487. doi:10.1056/NEJMoa1409405

74. Khoury JD, Medeiros LJ, Manning JT, Sulak LE, Bueso-Ramos C, Jones D. CD56(+) TdT(+) blastic natural killer cell tumor of the skin: a primitive systemic malignancy related to myelomonocytic leukemia. *Cancer*. 2002;94(9):2401-2408. doi:10.1002/cncr.10489
75. Montes-Moreno S, Ramos-Medina R, Martínez-López A, et al. SPIB, a novel immunohistochemical marker for human blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: characterization of its expression in major hematolymphoid neoplasms. *Blood*. 2013;121(4):643-647. doi:10.1182/blood-2012-08-447599

TABLES

patient number	Age, years	Sex	Sample	infiltration (%)	Hematological sites	Extra-hematological	Prior History (time before diagnosis)	Karyotype	Markers associated to pDC lineage	BPDCN score	Immature lineage markers*	Myeloid lineage markers*	B lineage markers*	T lineage markers*	anatomopathological confirmation
P1	38	M	PB	65	PB, BM	Skin	None	44,X,-Y,del(9)(q11q31),-13[2]/44,idem,add(4q?),add(5q?) [3]/46,XY[14]	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303+ CD304+ TCL1+	5/5	Tdt+	CD33+	None	CD2+	Yes
P2	69	M	BM	90	BM, LN	Skin	Colon cancer	46,XY[20]	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303- CD304+ TCL1+	3/5	None	None	None	CD7+	No
P3	70	M	PB	70	PB, BM	Skin	CMML	44,X,-Y,del(6)(q23q25~27)x2,add(8)(q24),inv(9)(p11q13)c,t(12;15)(p10;p10),-13[18]/46,XY,inv(9)(p11q13)c[2]	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303+ CD304+ TCL1+	5/5	None	CD33+ CD117+	None	neg	Yes
P4	51	M	PB	71	PB, BM, LN, spleen	Skin, gums	None	46,XY,del(6)(q11q22),del(9)(q11q13),del(10)(q12q13)[1]/46,XY,idem,i(7)(q10)[18]/46,XY[1]	CD4+ CD56+ CD123+ CD303+ CD304+ TCL1+	5/5	None	None	None	CD2+ CD5+ low (18%)	Yes
P5	15	M	BM	100	PB, BM, LN, spleen	Skin, liver	None	43 XY t(3.6),der(7)t(7,19),-9, der(12)t(5,12),-13,-19/86,idemx2	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303+ CD304+ TCL1+	5/5	None	None	None	neg (CD7 and CD2 NA)	Yes
P6	66	M	BM	74	PB, BM, LN	Skin	None	46,XY[20]	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303+ CD304+ TCL1+	5/5	None	CD33+	CD22+	CD7+	Yes
P8	60	M	PB	70	PB, BM, LN	Skin	None	46XY [18]/44, X, -Y, t(4;12), -9, -13, +mar [9]	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303+ CD304+ TCL1+	5/5	None	CD33+	None	CD7+ CD2+	Yes
P9	74	M	PB	75	PB, BM	Skin	None	46,XY[20]	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303+ CD304+ TCL1+	5/5	None	None	None	CD7+ CD2+	Yes
P11	59	M	BM	95	PB, BM, LN	Skin	None	45,XX,del(5)(q13q34),inv(11)(p11q21),der(15)t(15;18)(?;?),-18	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303+ CD304+ TCL1+	5/5	None	None	None	neg	Yes
P12	61	M	BM	82	PB, BM	Skin	None	46,XY[20]	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303- CD304+	3/5	None	None	None	CD2+	Yes
P18	75	F	PB	90	PB, BM, spleen	Skin	None	45,XX,del(5)(q13q34),?inv(11)(p11q21),der(15)(15qter-15q10::?:18q10-18qter),-18[15]/44,idem,-22,dmin[2]/88,idemx2,del(6)(q16)[2]/46,XX[1]	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303+ CD304+	5/5	None	None	None	CD7+	Yes
P89	82	M	PB	80	PB, BM, LN	Skin, tonsil	None	46,XY[20]	CD4+ CD56+ HLA-DR+ CD123+ CD303+ CD304+ TCL1+	5/5	None	CD33+	None	neg	No
P13	46	F	BM	NA	PB, BM	Absent	None	45, XX, del(1)(p21), -5, -7, del(11)(q13), del(13)(q13;q22), -15, +mar1 [3]/ 46, XX [17]	CD4+ CD56- CD123+ CD304+ CD303- TCL1+	2/5	Tdt+	CD117+	None	cCD3+ sCD3- CD2+ CD5+low (20%)	No

Table 1. Clinical and biological features of the cohort. DOD: Dead of disease; F: female; LN: lymph node; M: male; NA: not available; Neg = negative; None = no positive marker. * Only positive markers are indicated. Immature lineage marker: CD34, TdT; myeloid lineage marker: CD33, CD117, CD13, CD15, CD65, CD14, CD64, CD11c, MPO; B lineage marker: CD19, CD20, CD22, CD79a; T lineage marker: cCD3 and sCD3 (cytoplasmic and surface), CD2, CD7, CD4, CD8, TCR αβ, TCR γδ. BPDCN score: scoring system for BPDCN diagnostic (Garnache-Ottou et al. 2009²⁴⁶).

FIGURES

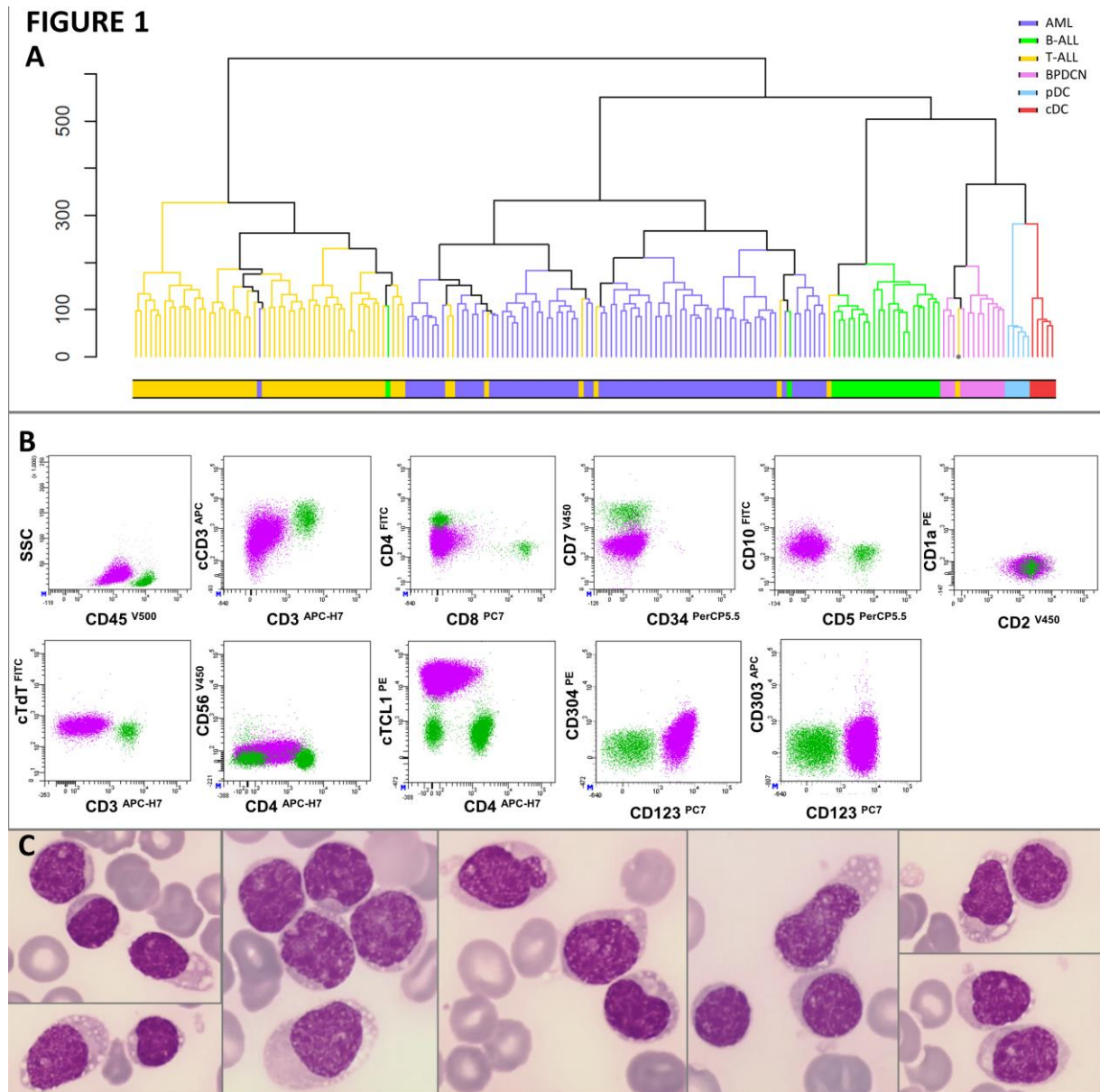


Figure 1. (A) Unsupervised hierarchical clustering of 176 AL patient and 10 normal DC transcriptomes: B-ALL (green), T-ALL (yellow), AML (purple), BPDCN (pink), reclassified patient P13 (grey), normal cDC (red), and normal pDC (light blue). (B) Flow cytometry analysis of patient P13 bone marrow: blastic population (purple) and CD45+ lymphocytes (green). The blastic population expresses CD45^{low} cCD3^{low} and CD4⁺, CD2⁺, CD10⁺ but no CD7 and surface CD3. The blastic population express the pDC markers CD123, TCL1^{high} and a low level of CD304. CD303 and CD56 were not expressed. (C) Bone marrow examination of patient P13 showed blasts, with regular nuclei and small nucleoli, no cytoplasmic granulation, rare small vacuoles and/or pseudopodia.

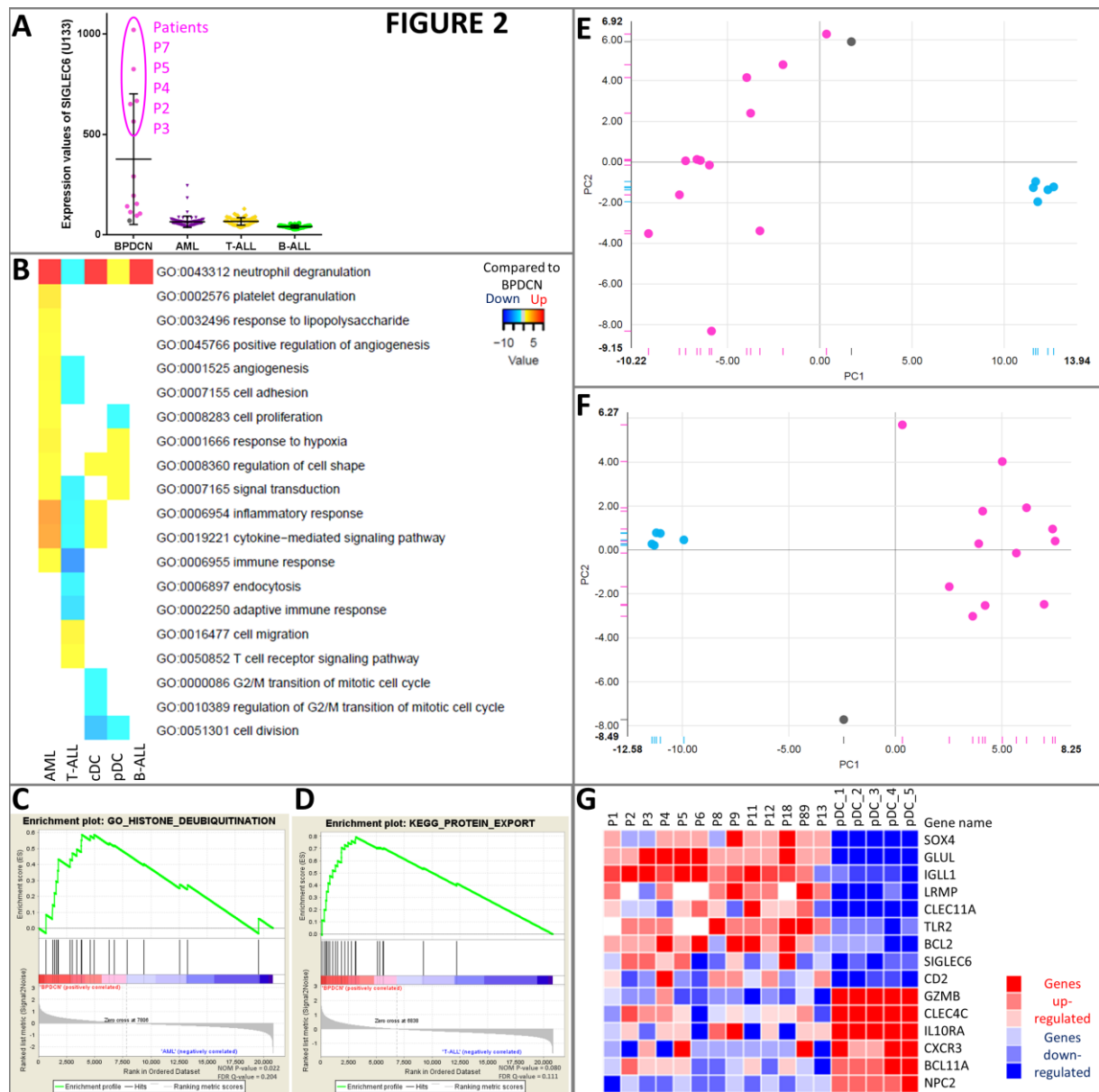


Figure 2. (A) Expression levels of SIGLEC6 probes on microarray. (B) Main Gene Ontology pathways deregulated for each type compared with BPDCN, using hypergeometric probability score with 20HM and p-value=0.05. Pathways downregulated are blue and upregulated are yellow to bright red. (C-D) GSEA examples of gene sets enriched in BPDCN compared to AML (C) or T-ALL (D). (E-F) Principal component analysis based on published signatures differentiating BPDCN from pDCs (E: Sapienza et al., 2014), (F: Villani et al., 2017). (G) Heatmap depicting the expression levels of selected genes upregulated (red) or downregulated (blue) in BPDCN compared to normal pDCs.

In dot plot, the 12 BPDCN are depicted in pink, patient P13 in grey, AML in purple, B-ALL in green, T-ALL in yellow and normal pDC in light blue.

B. Recherche de transcrits de *MYB* et *MYBL1* par LD-RT PCR

La détection des transcrits de fusion impliquant *MYB* ou *MYBL1* apparaît particulièrement intéressante car très spécifique des LPDC en hématologie. La mise au point d'une technique de LD-RT PCR permet de détecter ces réarrangements, mais aussi leurs gènes partenaires. En cours de mise au point de cette technique, nous avons rencontré des difficultés liées à des faux positifs (bruit de fond sur gel). Il en résulte des difficultés d'interprétation, plus simple sur gel de polyacrylamide que sur gel d'agarose avec la nécessité de contrôler sur un deuxième essai et de séquencer toute bande, même s'il peut s'agir de bandes aspécifiques (Figure 31).

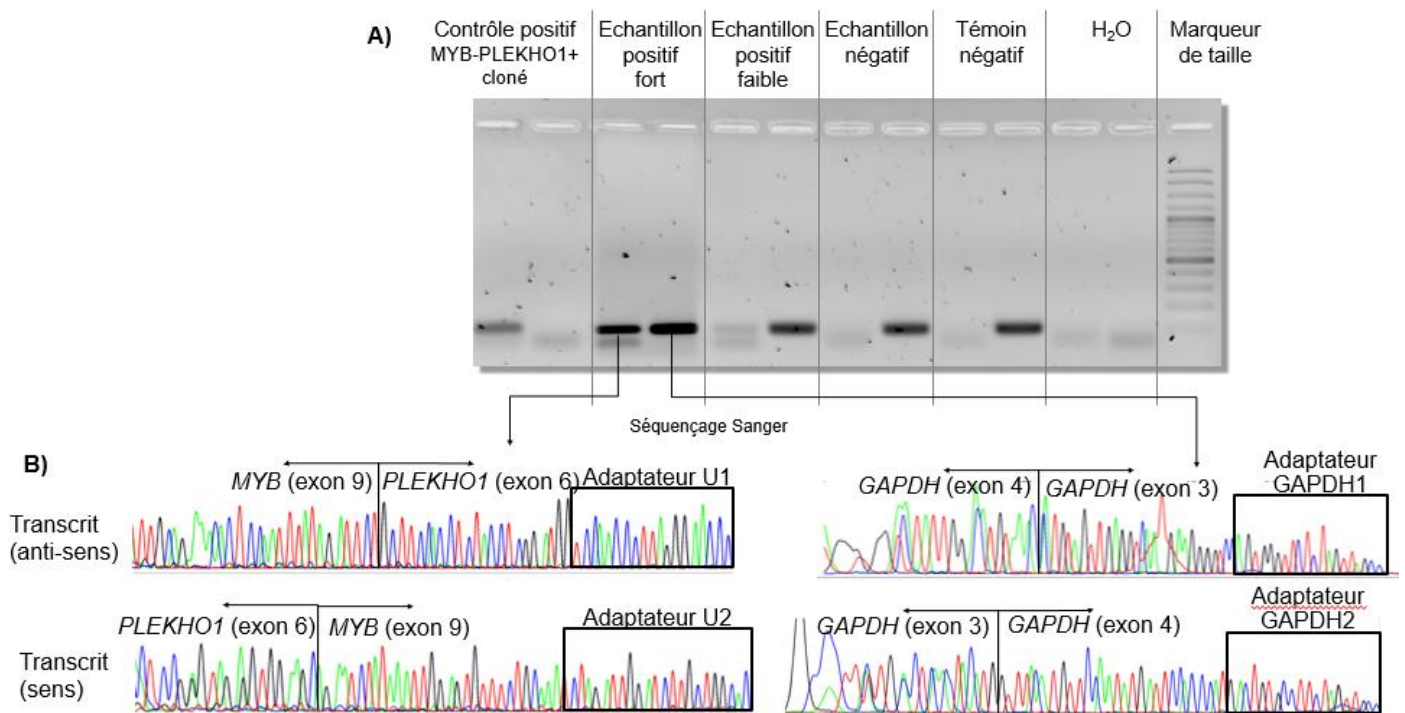


Figure 31 : Profils obtenus par LD-RT-PCR MYB/MYBL1/NR3C1

A) Profils après migration des produits de PCR obtenus sur gel d'agarose 2%, avec pour chaque échantillon, une PCR avec les amorces universelles U1 et U2 à gauche, et une PCR avec les amorces GAPDH1 et GAPDH2 à droite pour chaque échantillon. B) Séquences obtenues après séquençage par la méthode de Sanger. Exemple d'un échantillon positif pour *MYB-PLEKHO1*, et contrôle de la séquence du gène *GAPDH* à droite.

III. Discussion

A. Voies dérégulées

Les mécanismes physiopathologiques des LPDC sont encore à clarifier, et notre étude souligne à la fois la proximité des blastes de LPDC avec les pDCs physiologiques, mais aussi la dérégulation du cycle cellulaire et des mécanismes prolifératifs, propres à toute cellule tumorale. La transition G1/S du cycle cellulaire est particulièrement dérégulée, et les kinases *CDKN1B*, *CDKN2A* et *CDKN2B* du cycle cellulaire sont fréquemment délétées (69%), tandis que *BCL2* impliqué dans la survie cellulaire est surexprimé, tout comme *GLUL* qui est même gagné chez 3 patients en nombre de copies du gène. A cela s'ajoute la dérégulation de facteurs de transcription plus spécifiques, notamment *SOX4* qui est impliqué dans la différenciation lymphoïde mais aussi pDC par action sur *TCF4*²⁴⁷, entraînant un engagement dans la lignée pDC^{147,148}. Parmi les cibles de *SOX4*, qui sont associées aux pDCs, on retrouve également *NRP1*, le gène codant pour le CD304. La dérégulation de *SOX4* est observée dans le carcinome hépatocellulaire où elle promeut la migration cellulaire²⁴⁸. Le cluster de gènes *HOXA* est également délété, avec un impact potentiel sur l'adhésion cellulaire via ELAM and VCAM-1²⁴⁹ et la migration cellulaire, comme dans les métastases de tumeurs solides²⁵⁰.

Trois gènes précédemment décrits par des études indépendantes sont fréquemment délétés ou mutés dans notre cohorte, il s'agit d'*ETV6* (69%), *RB1* (69%) et *IKZF1* (62%)^{135,160,229,242}. La présence de mutations bialléliques d'*ETV6* chez 2 patients est en faveur d'un évènement primordial, potentiellement précoce, comme déjà suggéré²⁴². Pour la première fois, nous montrons que lorsque l'expression d'*ETV6* est basse, *TCL1A* est surexprimé comme c'est le cas dans les LPDC et dans un sous-groupe de LAL-B (Kruskal-Wallis, $p < 0.0001$). Ce lien apparait particulièrement fort, puisque Fears *et al.* avaient montré que la faible expression d'*ETV6* dans une lignée de LAL-B avec t(12 ;21)(p13 ;q22) était associée à une surexpression de *TCL1A*, et que la réintroduction d'*ETV6* entraînait une baisse d'expression de *TCL1A*²⁵¹.

Egalement, pris dans leur ensemble, les gènes de la famille *NTRK* sont délétés chez 9 patients sur 13 (69%) (1 *NTRK1*, 4 *NTRK2*, 3 *NTRK3* and 1 *NTRK2+NTRK3*), sans qu'ils n'aient jamais fait l'objet d'études dans les LPDC. Les pertes de fonction des gènes *NTRK* sont rares et leur rôle reste à déterminer²⁵², alors que leurs surexpressions sont bien décrites dans les tumeurs solides et les LA²⁵².

Un autre point important, concerne le système immunitaire, avec des délétions de gènes de régulation de l'IFN (*IFNGR1*, *IFI6*) et de reconnaissance des pathogènes (famille CLEC dont le marqueur *CLEC4C* (CD303)). Ceci pourrait expliquer le fait que le CD303 est négatif ou faible dans 25 à 30% des LPDC^{97,98}.

B. Une ontogénie incertaine

Le profil d'expression génique de la lignée cellulaire de LPDC CAL-1 se rapprochant des AS-DCs, l'hypothèse d'une telle origine cellulaire est à envisager⁷³. Cependant, nos résultats sont très variables d'un échantillon à l'autre, seulement 5 cas sur 13 exprimant *SIGLEC6* au niveau transcriptomique. Ces disparités peuvent faire évoquer la possibilité que les LPDC soient hétérogènes, avec certaines d'origine pDC canonique, et d'autre d'origine AS-DC. Cette hétérogénéité s'accompagnerait d'une expression variable de marqueurs lymphoïdes ou myéloïdes CD33, CD22, CD2 ou CD7^{42,98}.

Les faibles capacités de sécrétion d'IFN-I, que l'on retrouve dans les AS-DCs ne sont pas non plus systématiques dans les LPDCs, comme déjà démontré, avec certains cas capables de sécréter de l'IFN-I et d'autres non⁸⁹. Cependant, ces capacités moindres de sécrétions d'IFN-I ne doivent pas être un argument fort pour une origine AS-DC, car ils peuvent être imputables au processus tumoral, avec des délétions de gènes de l'IFN comme montré sur nos cas. De la même façon, l'expression du CD2, que l'on associe aux AS-DCs, pourrait être liée à l'hyperexpression tumorale de SOX4²⁵³. Rattacher les LPDC à une origine AS-DC est donc complexe.

De manière similaire, il est difficile de trancher quant à une origine lymphoïde ou myéloïde des LPDC en considérant le profil génétique de ces hémopathies. Les mutations des LPDC sont souvent comparées à celles des SMD et LAM, bien que non spécifiques, mais surtout les relations clonales démontrées entre LMMC et LPDC^{160,161}, suggèrent une origine myéloïde d'au moins une partie des LPDC via un progéniteur de type MDP. A l'inverse, une origine lymphoïde est supportée par l'hyperexpression d'*IGLL1*, *LRMP*, *BCL11A*, *BCL2* et de gènes classiques pour les hémopathies lymphoïdes tels que *BCL6*, *IKZF1*, *ETV6* et *MYC*. Ainsi, *IKZF1* est très fréquemment impacté dans les LPDC mais absent des processus tumoraux myéloïdes, à l'exclusion de tableaux très particuliers de LAM pédiatriques²⁵⁴. En fait, le profil myéloïde-like des LPDC concerne des anomalies préleucémiques (épigénétique, épissage) notamment *TET2* et *ASXL1* (85% de nos cas). Il pourrait s'agir d'un événement précoce, suivi d'anomalies oncogéniques non myéloïdes, de délétions d'*ETV6*, d'anomalies lymphoïde-like (*IKZF1/2/3*, *CDKN2A/B*, *ATM*, *MYC*, *STAT3*) ou non spécifiques (*NRAS*, *KRAS*, *TP53*) au sein d'une cellule s'engageant vers une lignée pDC ou AS-DC.

C. Améliorer le diagnostic

L'hétérogénéité des LPDC est évidente du point de vue génétique, mais aussi phénotypique, avec un risque de diagnostic erroné, comme illustré par le cas P13. Les LA immatures n'exprimant qu'un seul marqueur T ou myéloïde rentrent particulièrement dans le diagnostic différentiel des LPDC, *a fortiori* si des atteintes cutanées sont retrouvées, notamment pour les LAL-T cCD3⁺ sCD3⁻ CD7⁻ sans réarrangement des TCR γ et TCR δ . Dans de tels cas, les marqueurs les plus spécifiques des LPDCs doivent être recherchés, par CMF ou IHC, notamment TCL1, CD303, RUNX2, HES6 et TCF4^{148,204}. Dans cette optique, notre équipe a développé de nouveaux marqueurs, notamment ILT7, NG2, FCER1, LAMP5, TCF4, qui font l'objet d'un article en cours de rédaction.

Sur le plan génétique, la détection des transcrits de fusion impliquant *MYB* apparaît particulièrement intéressante et nous avons souhaité développer une technique de biologie moléculaire, basée sur la LD-RT PCR. La mise au point de cette technique fait également l'objet d'un article en cours de rédaction. Au cours de la mise au point de cette technique, nous avons rencontré des difficultés liées à des faux positifs (bruit de fond sur gel). *In fine*, il apparaît que seulement 2 patients sur les 30 étudiés présentent un transcrit impliquant *MYB*, ce qui est inférieur à la littérature, mais les 2 études publiées se sont intéressées à une population japonaise, avec des réarrangements chez beaucoup d'enfants, ce qui ne correspond pas à l'épidémiologie classique de la maladie, l'âge médian étant compris entre 60 et 70 ans^{103,108}. Nous confirmons tout de même la présence de réarrangements récurrents de *MYB* dans les LPDC, sur une cohorte européenne de LPDC, indépendante de la cohorte japonaise et d'âge adulte. A noter que nous n'explorons pas les formes cutanées isolées, qui pourraient également être génétiquement différentes.

D. Différents sous-types de LPDC ?

Notre étude génétique et transcriptomique ayant révélé une hétérogénéité des LPDC, nous cherchons à présent à déterminer si cette hétérogénéité peut s'expliquer par l'existence de sous-types différents de LPDC, liés à l'origine AS-DC/DC ou à d'autres facteurs (anomalies génétiques, réarrangements de *MYB*/*MYC*). Ainsi, par analyse transcriptomique non supervisée, deux profils d'expression génique clairement différents ont été identifiés, délimitant deux groupes au sein de nos 13 cas, un groupe de 6 patients et un autre de 7 patients. Ces deux groupes sont confirmés en appliquant diverses signatures, de précurseurs myéloïdes et lymphoïdes, (Sapienza *et al.* 2014), de métabolisme mitochondrial, d'ubiquitylation, ou de dommage à l'ADN. Les analyse en GSEA sont cohérentes, avec un groupe enrichi en gènes du Golgi, du transport vésiculaire, des cibles de MYC et du cycle de Krebs, tandis que l'autre est enrichi en gènes du métabolisme des stéroïdes, de l'efflux de cholestérol, de migration et adhésion cellulaire.

Les anomalies génétiques de ces deux groupes seraient potentiellement différentes, avec des réarrangements de *MYB* ou *MYC* dans un groupe, et d'autres anomalies, des délétions de *NR3C1* dans l'autre groupe. Certaines caractéristiques cliniques sont potentiellement différentes, telles que l'âge, le sexe et le pronostic (Figure 32).

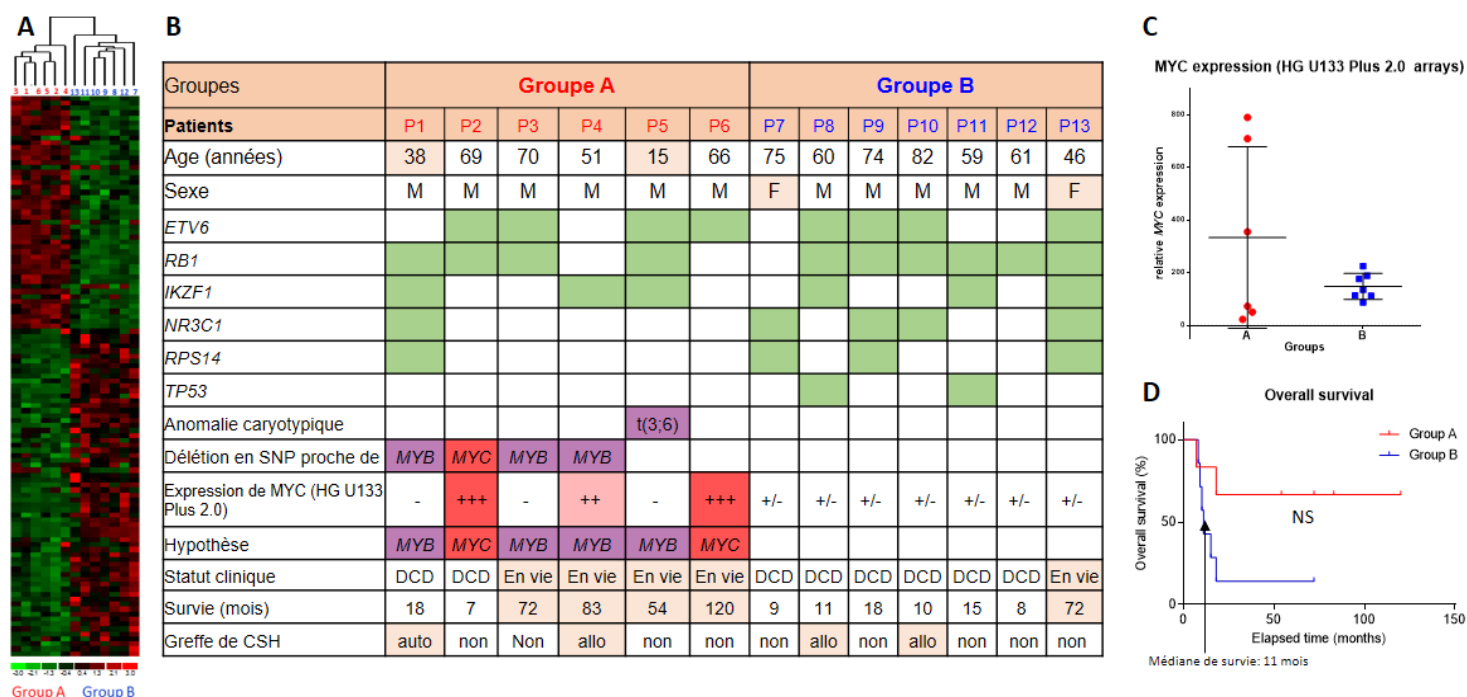


Figure 32 : Identification de 2 groupes potentiels de leucémies dérivées de pDC

A. Analyse hiérarchique non supervisée de nos 13 LPDC (signature minimale de 113 sondes). B. Principales caractéristiques cliniques et génétiques des 13 LPDC. Délétions en vert, gains d'expression en rouge, réarrangements de *MYB* en violet. DCD= décédé de l'hémopathie. C. Expression relative de *MYC* (HG U133 Plus 2.0). D. Courbes de survie globale. NS, non significatif.

Cependant, les effectifs sont trop faibles et nécessitent d'être confirmés sur une cohorte de validation. Trente patients sont ainsi en cours d'analyse par RNA-seq (CGFL, Dr. Romain Boidot, Dijon et IRCM, Pr. Jacques Colinge, Montpellier) dans le cadre du PRT-K19-069 FreGATE-pDC (*French Genetic And Transcriptomic Exploration in pDC leukemias*), projet financé pour 3 ans (279 224€) (Figure 33). Deux fractions sont étudiées pour chaque patient : la fraction des cellules tumorales blastiques et la fraction des lymphocytes, non tumoraux. Des sujets sains ont également été inclus, avec une fraction lymphocytaire et une fraction de pDC, afin de disposer de contrôles. Ainsi, des informations sur les transcrits de fusion présents et les profils d'expression génique pourront être exploitées et une analyse globale (IRCM, Jacques Colinge, Montpellier) permettra d'évaluer le pronostic et de concevoir de nouvelles approches thérapeutiques dans cette pathologie.

Ce projet sera complété par une étude de méthylation de l'ADN (UMR1098, Eric Hervouet, Besançon, plateforme EPIGENExp), notamment par étude de la méthylation globale des 5-méthylcytosine (5meC) et 5-hydroxyméthylcytosine (5hmeC) via des kits ELISA pour 30 patients, et de 5 donneurs sains. Des données plus fines seront également obtenues par immunoprécipitation d'ADN méthylé et séquençage haut débit (MeDIP-seq pour *Methylated DNA ImmunoPrecipitation Sequencing*) pour 10 patients, et séquençage après traitement bisulfite afin d'étudier les îlots CG sur les promoteurs de gènes d'intérêt.

Des études fonctionnelles viseront ensuite à étudier plus précisément certains gènes d'intérêt mis en évidence, sur modèles *in vitro* avec transduction ou invalidation génique (CRISPR/Cas9) dans les lignées de LPDC CAL-1 et GEN 2.2, et sur modèles *in vivo* de xénogreffes de cellules primaires de patients dans des souris NSG (*NOD/SCID/IL2R γ c-deficient*) ou NSGS (*NSG expressing human IL3, GM-CSF and SCF*)

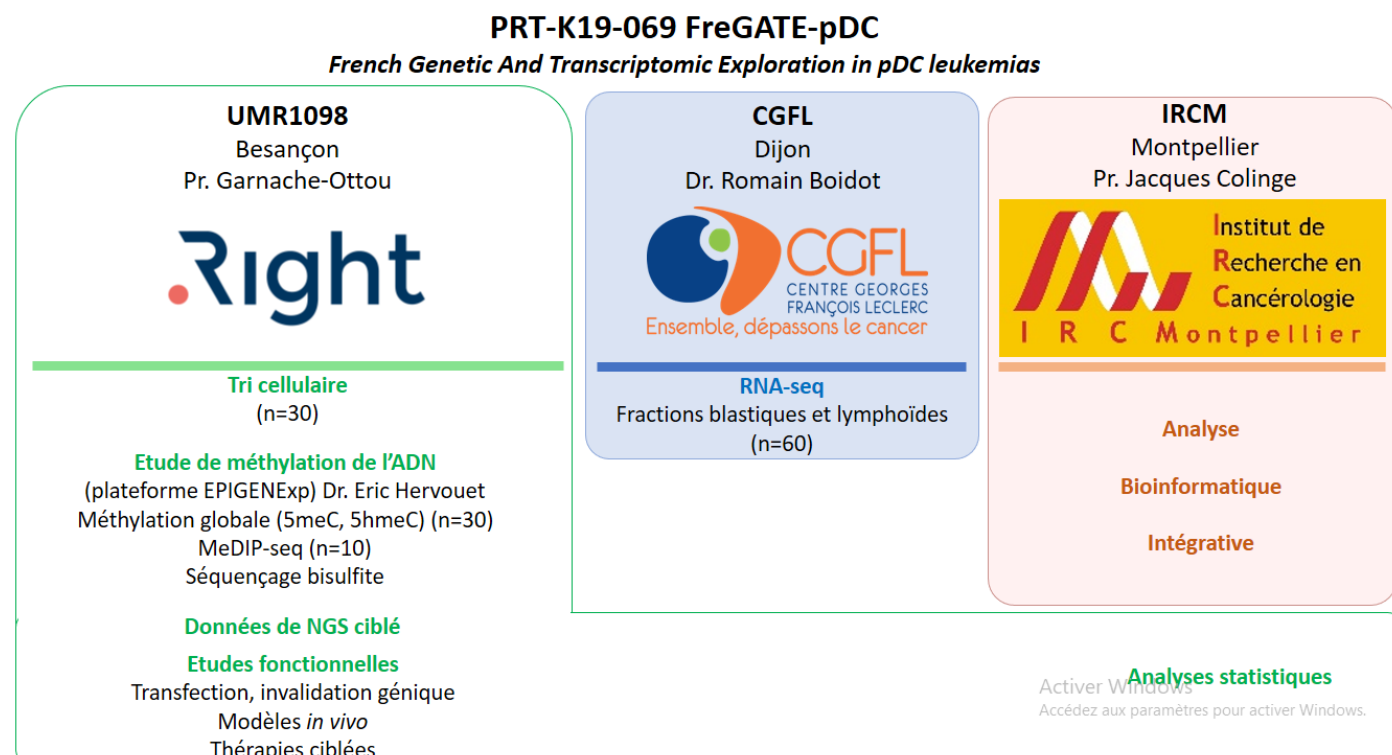


Figure 33 : Collaboration académique dans le cadre du projet FreGATE-pDC (PRT-K19-069)

E. Développement de nouvelles approches thérapeutiques

Actuellement, aucun consensus de traitement n'est appliqué pour cette hémopathie, cependant les données de la littérature montrent de meilleurs résultats avec des schémas thérapeutiques type LAM ou LAL²⁵⁵. Malgré une bonne réponse initiale quelle que soit la chimiothérapie instaurée, la rechute est presque systématique et rapide avec résistance aux traitements initiaux. Le pronostic est donc très défavorable avec des médianes de survie de 8 à 12 mois^{100,121}. A l'heure actuelle, l'unique traitement permettant une survie à plus long terme est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allogreffe)^{98,121,128,255–260}.

Afin d'améliorer la prise en charge et les soins de ces patients, l'équipe a développé un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC-K16-093). Il vise à standardiser le traitement d'induction avant la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Pour la première fois, cet essai fournira une série historique de patients traités de manière homogène et il facilitera la collecte d'échantillons biologiques. De nouvelles thérapies ciblées ont été décrites sur quelques cas dans les LPDCs, notamment le vénétoclax, le bortézomib, le carfilzomib et la 5-azacytidine^{261–263} (Figure 34). Cependant, l'usage de ces molécules ne prend pas toujours en compte le fond génétique et transcriptomique propre au patient. L'acquisition de nouvelles données moléculaires permettront de préciser les nouvelles molécules ou associations à tester sur modèles murins, afin de cibler des dérégulations, de manière similaire aux études menées par l'équipe sur les agonistes de LXR ou le bortézomib^{203,262}. Notamment, des combinaisons de molécules seront testées en fonction de potentiels sous-types de LPDC. Des stratégies de réversion des profils de méthylation pourront être envisagées via des agents hypométhylants (5-azacytidine, décitabine) afin de restaurer l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et provoquer une mort cellulaire, comme déjà reporté²⁶¹. Ces stratégies intégreront les données moléculaires collectées, comme démontré dans les SMD, où les patients mutés pour *TET2* répondent mieux aux agents hypométhylants²⁶⁴. Ces essais chez la souris pourront constituer une première étape, avant un transfert ensuite chez l'Homme, dans le cadre de protocoles dérivés du PHRC-K16-093.

En plus de la piste épigénétique comme biomarqueur théranostique, le statut *MYC*-réarrangé ou non pourrait également constituer un biomarqueur d'intérêt. En effet, Sakamoto *et al.* ont montré que les inhibiteurs de motifs extra-terminaux à bromodomaines (BET) ou d'Aurora kinases seraient plus efficaces sur la lignée cellulaire de LPDCP *MYC*-réarrangée CAL-1 par rapport à la lignée non réarrangée PMDC05¹⁰⁸.

Les approches ciblant le CD123 sont prometteuses dans les LPDC^{118,244,265,266} et pourront être associées à d'autres molécules. Notre équipe a ainsi conçu un médicament de thérapie innovante basé sur la technologie des cellules T à récepteurs chimériques à l'Ag CD123 (CAR T-cell CD123) avec une validation pré-clinique du CAR T-cell CD123 (PRT-K15-175)²⁴⁴ et un passage en phase de transfert vers la clinique. Ce CAR-T cell pourra être associé à d'autres molécules éventuellement en fonction de sous-groupes moléculaires.

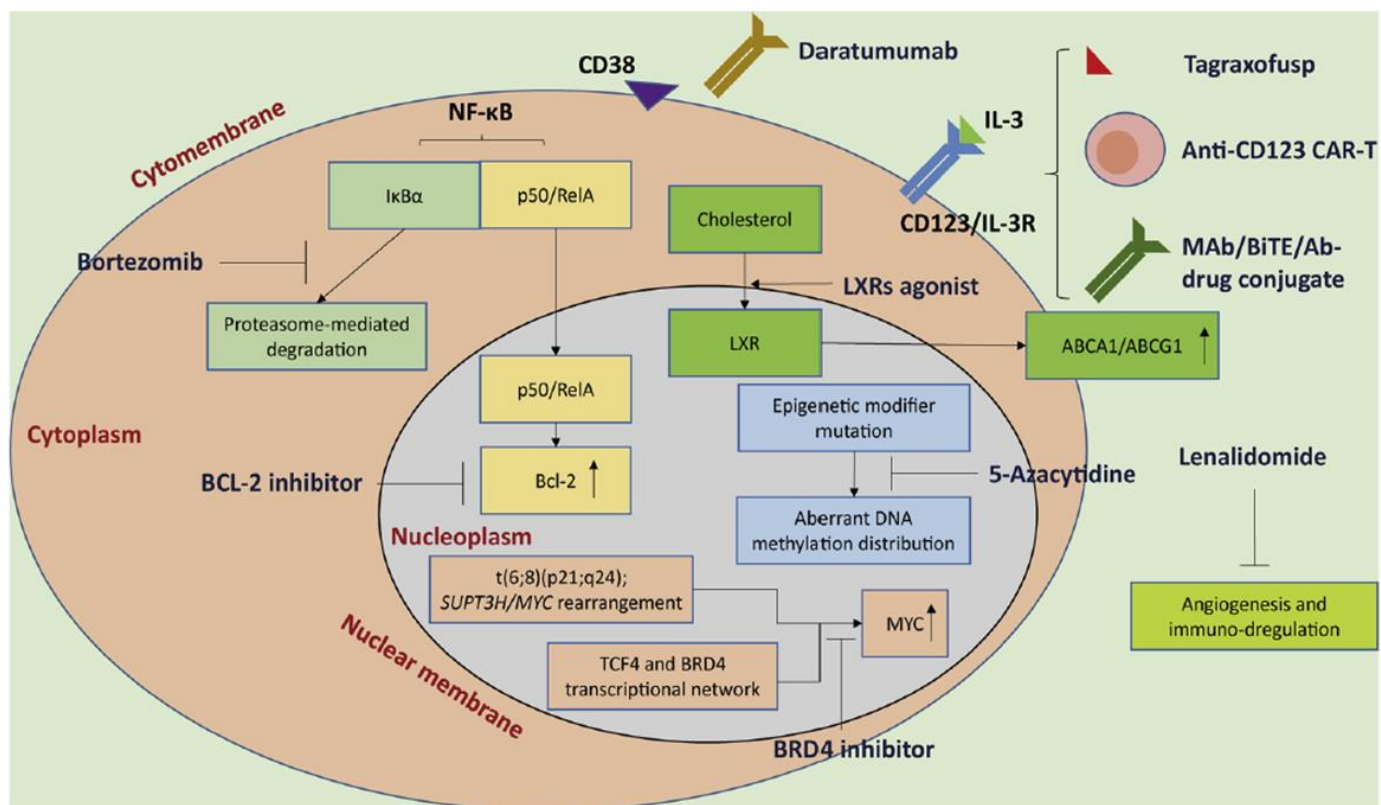


Figure 34 : Approches thérapeutiques envisagées dans les LPDC, d'après Zhang *et al.*, 2020²⁶⁷

F. Micro-environnement tumoral

Ces dernières années, l'étude du micro-environnement tumoral est devenue primordiale dans la compréhension des mécanismes de résistance des tumeurs. En effet, le micro-environnement tumoral développe des propriétés immunosuppressives évitant une élimination des cellules tumorales par le système immunitaire. L'activation du LT est régulée par la CPA, avec d'une part la liaison du TCR du LT au CMH, et d'autre part un signal de co-stimulation tel que la liaison du CD80 ou du CD86 de la CPA avec le CD28 du LT (Figure 35). A l'inverse, des récepteurs de co-inhibition, les *immune checkpoints* tels que CTLA-4, PD-1, TIM-3 ou LAG-3 peuvent mettre fin à l'activation du LT par interaction avec leur ligand sur la cellule tumorale tels que PD-L1 et PD-L2 pour PD-1, et la Galectine-9 qui est un activateur majeur de TIM-3²⁶⁸.

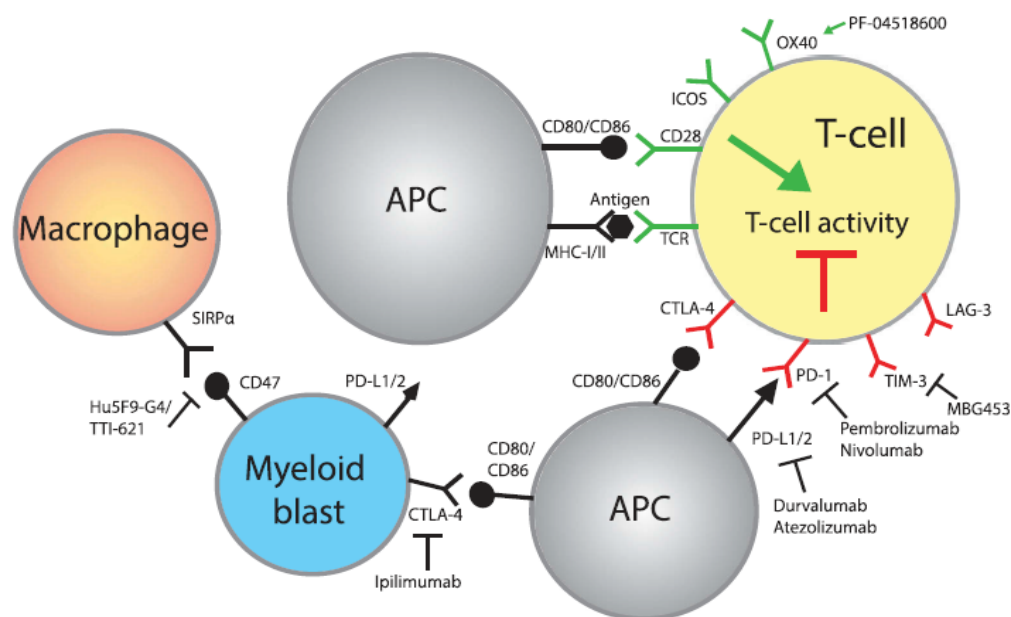


Figure 35 : La synapse immunologique : principales molécules *immune checkpoints* dans les LAM

APC, cellule présentatrice d'antigènes. Bewersdorf *et al.*, 2019, Expert Review of Anticancer Therapy²⁶⁸.

Dans les LAM en rechute, on constate ainsi une augmentation de l'expression de PD-1 ou TIM-3 par les LT médullaires conduisant à un épuisement immunitaire^{269,270}. L'usage d'inhibiteurs de ces *immune checkpoints*, tels que des anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1 permet de réactiver l'efficacité des LT dans certains types de tumeurs solides, de lymphomes²⁷¹⁻²⁷³ et même dans les LAM et les SMD^{268,274}. Dans les LPDC, les données concernant le micro-environnement lymphocytaire et l'expression des *immune checkpoints* sont encore insuffisantes et discordantes^{275,276}. Pourtant, la cellule tumorale dans les LPDC étant une CPA, cellule clé pour induire une réponse immunitaire adaptative et une tolérance, une prolifération de telles cellules pourrait entraîner une reprogrammation immunitaire conséquente. De plus, cette hémopathie étant caractérisée par des rechutes quasi-systématiques, cela pourrait être lié à l'inhibition du système immunitaire par épuisement des LT. Notamment, les pDCs physiologiques expriment des gènes immunorégulateurs, tels que les ligands de *checkpoints* immunitaires. Les pDCs tumorales pourraient ainsi induire un épuisement des LT et une activation des LT régulateurs.

Dans cette optique, nous avons réalisé une étude préliminaire du micro-environnement médullaire dans le cadre du Master 2 de Lou Soret. Cette étude a débuté *in silico* à partir de nos données transcriptomiques sur nos 13

LPDC, en utilisant l'interface CIBERSORT (Cell-type Identification By Estimating Relative Subsets Of RNA Transcripts)²⁷⁷. Cette approche permet d'estimer les proportions relatives de différents types cellulaires inclus dans l'analyse. L'analyse réalisée nous a montré que les LB de nos échantillons sont augmentés par rapport aux échantillons de sang et MO normaux, mais aussi par rapport aux LAM et aux LAL T (Figure 36). Il est aussi mis en évidence une augmentation de la population des LT régulateurs naïfs. Toutefois, les résultats relatifs de LT CD4 et LT CD8 sont aberrants par rapport aux pourcentages de LT Th1/2/17 et LT régulateurs.

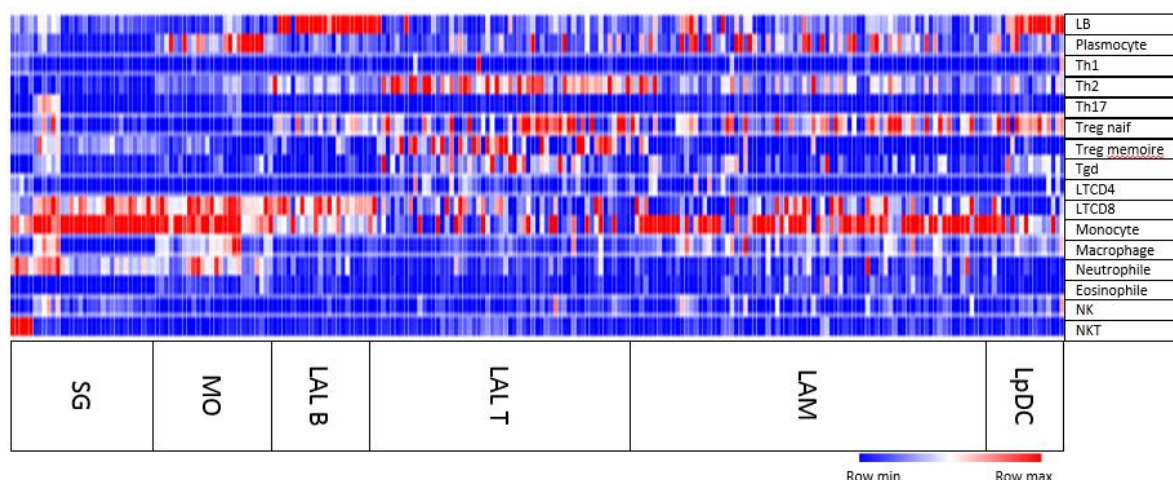


Figure 36 : Analyse par CIBERSORT des données de transcriptomique des 13 LPDC

Les LPDC ont été comparées aux autres LA et à des échantillons de sang et de moelle osseuse normaux. Les populations relativement plus élevées sont en rouge et les populations relativement plus basses sont en bleu. Notamment, les LB augmentés dans les LPDC et les LAL-B par rapport aux LAM, aux LAL-T, aux MO normales et aux échantillons sanguins normaux. MO : Moelle osseuse normale. SG : sang normal.

Ces données ont également été complétées par une étude par cytométrie en flux du microenvironnement médullaire de 5 cas de LPDC. Des marqueurs de LT régulateurs, de LB régulateurs, les checkpoints immunitaires et leurs ligands sur les blastes ont été inclus dans le panel de cytométrie (Tableau 6). Les résultats obtenus par CMF confirment la présence de LT régulateurs et de LB régulateurs de type CD24^{high} CD27⁺ qui représentent la population régulatrice B responsable de la suppression de l'activité des LT CD4⁺²⁷⁸. Cependant, cet essai s'est révélé trop consommateur en matériel biologique, nous n'avons pas pu conclure sur si peu d'échantillons et nous souhaitons maintenant affiner nos hypothèses avant de compléter ce travail.

Tableau 6: panel de cytométrie en flux pour l'analyse des échantillons de LPDC

Description des anticorps et fluorochromes utilisés.

	AlexaF488	PE	PerCP Cy 5.5	PE-Cy7	AlexaF647	APC AF700	APC Fire750	BV 421	Krome orange	BV605
Tube Treg+ Checkpoints	CD4	CTLA-4/CD152	CD45RA	PD-1/CD279	FOXP3	FVS	CD3	CD25	CD8	TIM-3
Tube B+NK	CD24	IgD PE	CD27	CD19	CD45	FVS	CD3	CD38	CD56	CD5
Tube Blaste	CD123	Galectin-9	-	CD80	CD86	FVS	CD45	CD273	-	CD274

Pour cela, le projet FreGATE-pDC (PRT-K19-069) intègre l'étude des fractions lymphocytaires comme fractions non tumorales. Cela nous permettra également d'évaluer le micro-environnement tumoral lymphocytaire des LPDC, et d'apporter un rationnel à des explorations phénotypiques ultérieures, sur moelle osseuse, ou sur biopsie cutanée, puisque les deux sites privilégiés d'atteintes tumorales pourraient présenter des micro-environnements tumoraux différents. Nous espérons également apporter un rationnel à l'usage d'inhibiteurs d'*immune checkpoints* dans les LPDC.

En conclusion, une meilleure caractérisation des LPDC reste nécessaire, et nous poursuivons nos efforts dans ces thématiques complémentaires que sont l'étude transcriptomique des cellules blastiques, l'étude du microenvironnement tumoral, l'optimisation de la démarche diagnostique, la recherche de facteurs pronostiques et le développement d'approches thérapeutiques innovantes.

Partie II : Etude des LAM - pDC

I. Matériel et méthodes

Les techniques utilisées ne sont que brièvement décrites ici car elles sont l'objet de l'Article 2.

A. Matériel biologique et analyse phénotypique

1. Matériel biologique

Parmi les échantillons adressés à Besançon pour suspicion de LPDC, certains se sont avérés être des PPDCM. Ils ont permis de constituer une cohorte annexe d'une cinquantaine de cas à l'heure actuelle à partir de laquelle 15 LAM-pDCs ont été analysés et font l'objet de l'Article 2 de ce manuscrit. Ces échantillons ont été comparés à 11 fractions de pDCs normales provenant de donneurs sains prélevés à l'Etablissement Français du Sang Bourgogne-Franche-Comté.

2. Analyse phénotypique

De manière similaire aux LPDC, les profils phénotypiques ont été obtenus ont été réalisés de manière prospective par CMF en utilisant un FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA).

B. Analyse moléculaire

1. Tri cellulaire préalable

Les échantillons de notre cohorte de 15 LAM-pDC pour l'Article 2 correspondaient à un mélange hétérogène de blastes immatures, de pDCs, de monocytes, de LT, et parfois de cDCs également en excès. Afin d'étudier les anomalies moléculaires de ces populations cellulaires indépendamment, des tris cellulaires ont été réalisés sur 1 à 10 millions de cellules primaires en utilisant un ARIA III FACS (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA).

2. Séquençage haut débit (NGS) ciblé

Les études de NGS ciblé ont été réalisées grâce à des designs HaloPlex^{HS} (Agilent, Santa Clara, CA, USA) pour Illumina, puis les bibliothèques obtenues ont été séquencées sur MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). L'analyse bioinformatique a été réalisée en collaboration avec l'UMR1245 à Rouen (P-J Vially). Le panel de gènes est détaillé en Tableau 7.

Tableau 7 : panel de gènes du design HaloPlex^{HS} Target Enrichment System pour Illumina dans les LAM-pDC

Nom du gène	Taille (pb)	Transcrit	Nom du gène	Taille (kb)	Transcrit
<i>APC</i>	2185	NM_001127511	<i>PTPN11</i>	347	NM_002834
<i>ASXL1</i>	2906	NM_015338	<i>RB1</i>	481	NM_000321
<i>ATM</i>	9556	NM_000051	<i>RET</i>	403	NM_020975
<i>BCL6</i>	2121	NM_001134738	<i>RUNX1</i>	1385	NM_001001890
<i>BCOR</i>	6115	NM_001123385	<i>SETBP1</i>	5100	NM_015559
<i>BIRC3</i>	734	NM_001165	<i>SF3A2</i>	80	NM_007165
<i>BRAF</i>	49	NM_004333	<i>SF3B1</i>	999	NM_012433
<i>BTK</i>	1986	NM_000061	<i>SF3B4</i>	80	NM_005850
<i>CALR</i>	1254	NM_004343	<i>SHOC2</i>	100	NM_001324336
<i>CARD11</i>	1121	NM_032415	<i>SRSF2</i>	362	NM_003016
<i>CBL</i>	336	NM_005188	<i>SSC5D</i>	160	NM_001144950
<i>CD79A</i>	115	NM_001783	<i>STAT3</i>	656	NM_003150
<i>CD79B</i>	42	NM_000626	<i>TCL1A</i>	710	NM_001098725
<i>CDKN2A</i>	1047	NM_001195132	<i>TET2</i>	6071	NM_001127208
<i>CEBPA</i>	1077	NM_004364	<i>TNFAIP3</i>	2373	NM_001270507
<i>CRIPAK</i>	1340	NM_175918	<i>TP53</i>	1182	NM_001126112
<i>CSF3R</i>	2697	NM_000760	<i>U2AF1</i>	904	NM_000546
<i>CXCR4</i>	1043	NM_001008540	<i>UBE2G2</i>	493	NM_182688
<i>DNMT3A</i>	4057	NM_022552	<i>VHL</i>	640	NM_000551
<i>ETV6</i>	1358	NM_001987	<i>WT1</i>	1564	NM_024426
<i>EZH2</i>	2530	NM_001203247	<i>ZEB2</i>	3637	NM_014795
<i>FBXW7</i>	619	NM_033632	<i>ZRSR2</i>	1457	NM_005089
<i>FLT3</i>	3004	NM_004119			
<i>GNB1</i>	160	NM_001282539			
<i>IDH1</i>	100	NM_005896			
<i>IDH2</i>	161	NM_002168			
<i>IKZF1</i>	1553	NM_001220771			
<i>IKZF2</i>	1590	NM_001291845			
<i>IKZF3</i>	1522	NM_016260			
<i>IRF8</i>	2661	NM_002163			
<i>JAK2</i>	216	NM_004972			
<i>KIT</i>	551	NM_000222			
<i>KRAS</i>	460	NM_004985			
<i>MAP2K1</i>	478	NM_002755			
<i>MET</i>	721	NM_000245			
<i>MLH1</i>	80	NM_001258274			
<i>MPL</i>	97	NM_005373			
<i>MYD88</i>	452	NM_001172568			
<i>NEFH</i>	2541	NM_021076			
<i>NOTCH1</i>	2286	NM_017617			
<i>NOTCH2</i>	2091	NM_024408			
<i>NRAS</i>	290	NM_002524			
<i>PAX3</i>	1508	NM_181458			
<i>PHF6</i>	1089	NM_001015877			
<i>PTEN</i>	406	NM_000314			

II. Résultats

Article 2 : étude des LAM-pDC : “Plasmacytoid dendritic cells proliferation associated with acute myeloid leukemia: phenotype profile and mutation landscape”

Résumé

Nous avons comparé 15 LAM-pDC à 21 LPDC et 11 fractions de pDCs normales issues de donneurs sains. Des blastes immatures CD45^{faible} CD34⁺ sont retrouvés dans tous les cas de LAM-pDC (10 à 80 % des cellules médullaires), associés à des pDCs (4-36 %), des monocytes (1-10%) et des cDCs pour 2 cas (4,8-19%). Les blastes expriment fréquemment le CD123, mais plus faiblement que les pDCs (MFIR: 14 vs 173; $p < 0.0001$) et n'expriment pas les marqueurs plus spécifiques des pDCs. Les pDCs ont un phénotype proche des pDC normales et nettement différent de celui des LpDC : elles sont toujours CD56⁻, le plus souvent CD303⁺, CD304⁺ et CD34⁺ avec une expression plus faible de cTCL1 et CD123 que les LpDC. Des marqueurs lymphoïdes isolés (CD22/CD7/CD5) dans certains cas, suggèrent un stade pré-pDC, comme défini par Martin-Martin *et al.*⁴⁶. Ces pDCs sont CD34⁺ dans 33% des cas avec un continuum de maturation observé entre les blastes et les pDCs (augmentation d'expression des CD45, CD123, CD304, CD303). Dans tous les cas, les pDCs, monocytes et cDCs sont néoplasiques puisqu'ils présentent les mêmes mutations que les blastes CD34⁺. *RUNX1* est le gène le plus fréquemment muté (73% des cas). A cela s'ajoute notamment des mutations de gènes d'épissage (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*) et de modificateurs épigénétiques (*DNMT3A*, *TET2*). De façon surprenante, ces mutations de *RUNX1* concernent 100% des LAM les plus immatures, à différenciation minimale (LAM0 de la classification FAB) de notre cohorte, et aucune autre LAM évaluée, c'est-à-dire des LAM1, LAM4 et LAM5 (association significative $\chi^2=12,90$, 1df, $p\text{-value}=0,0003$).

En conclusion, les LAM-pDC sont insuffisamment décrites et probablement sous-diagnostiquées. Dans notre cohorte, les blastes ont un phénotype peu différencié et les pDCs sont toujours CD4⁺ CD56⁻, ce qui les distingue clairement des LPDC. On retrouve une origine clonale commune des blastes, des pDCs, des monocytes et même des cDCs pour le cas testé, avec un continuum de maturation entre blastes et pDCs ou entre blastes et monocytes. Ces résultats suggèrent la prolifération de progéniteurs à potentialités dendritiques (pDCs et cDCs) et monocytaires comme les MDP, dans un modèle d'ontogénie myéloïde. Malgré le faible nombre de cas étudiés, l'association systématique entre LAM0, excès de pDC et mutations de *RUNX1* est remarquable. Des études supplémentaires, sur de plus larges cohortes permettraient de préciser l'entité provisoire des LAM *RUNX1*-mutées⁸³, d'évaluer si toutes les LAM0 *RUNX1*-mutées présentent un excès de pDC, et si elles correspondent à une prolifération de MDP.

Plasmacytoid dendritic cells proliferation associated with acute myeloid leukemia: phenotype profile and mutation landscape

by Loria Zalmay, Pierre-Julien Vially, Sabeha Büchle, Meyling Cheok, Lou Soret, Fanny Angelot-Delettre, Tony Petrella, Marie-Agnès Collonge-Rame, Estelle Seilles, Sandrine Geffroy, Eric Deconinck, Etienne Daguindau, Sabrina Bouyer, Elodie Dindinaud, Victor Baunin, Magali Le Gaff-Tavernier, Damien Roos-Weil, Orianne Wagner-Ballon, Véronique Salaun, Jean Feuillard, Sophie Brun, Bernard Drenou, Caroline Mayeur-Rousse, Patricia Okamba, Véronique Dorvaux, Michel Tichioni, Johann Rose, Marie-Thérèse Rubio, Marie-Christine Jacob, Victoria Raggieneau, Claude Preudhomme, Philippe Saas, Christophe Ferrand, Olivier Adotevi, Christophe Roumier, Fabrice Jardin, Francine Garnache-Ottou, and Florian Renosi

Haematologica 2020 [Epub ahead of print]

Citation: Loria Zalmay, Pierre-Julien Vially, Sabeha Büchle, Meyling Cheok, Lou Soret, Fanny Angelot-Delettre, Tony Petrella, Marie-Agnès Collonge-Rame, Estelle Seilles, Sandrine Geffroy, Eric Deconinck, Etienne Daguindau, Sabrina Bouyer, Elodie Dindinaud, Victor Baunin, Magali Le Gaff-Tavernier, Damien Roos-Weil, Orianne Wagner-Ballon, Véronique Salaun, Jean Feuillard, Sophie Brun, Bernard Drenou, Caroline Mayeur-Rousse, Patricia Okamba, Véronique Dorvaux, Michel Tichioni, Johann Rose, Marie-Thérèse Rubio, Marie-Christine Jacob, Victoria Raggieneau, Claude Preudhomme, Philippe Saas, Christophe Ferrand, Olivier Adotevi, Christophe Roumier, Fabrice Jardin, Francine Garnache-Ottou, and Florian Renosi.

Plasmacytoid dendritic cells proliferation associated with acute myeloid leukemia: phenotype profile and mutation landscape

Haematologica. 2020; 105:xxx

doi:10.3324/haematol.2020.253740

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

Plasmacytoid dendritic cells proliferation associated with acute myeloid leukemia: phenotype profile and mutation landscape

Loria Zalmai¹, Pierre-Julien Vially², Sabeha Biichle³, Meyling Cheok⁴, Lou Soret³, Fanny Angelot-Delettre³, Tony Petrella⁵, Marie-Agnès Collonge-Rame⁶, Estelle Seilles³, Sandrine Geffroy^{4,7}, Eric Deconinck⁸, Etienne Daguindau⁸, Sabrina Bouyer⁹, Elodie Dindinaud⁹, Victor Baunin¹⁰, Magali Le Garff-Tavernier¹¹, Damien Roos-Weil¹², Orianne Wagner-Ballon¹³, Véronique Salaun¹⁴, Jean Feuillard¹⁵, Sophie Brun¹⁶, Bernard Drenou¹⁷, Caroline Mayeur-Rousse¹⁸, Patricia Okamba¹⁹, Véronique Dorvaux²⁰, Michel Tichionni²¹, Johann Rose²², Marie Thérèse Rubio²³, Marie Christine Jacob²⁴, Victoria Raggueneau²⁵, Claude Preudhomme^{4,7}, Philippe Saas³, Christophe Ferrand³, Olivier Adotevi³, Christophe Roumier^{4,7}, Fabrice Jardin², Francine Garnache-Ottou³ and Florian Renosi³.

¹*Service d'hématologie biologique, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France*

²*INSERM U1245, Centre Henri Becquerel, Rouen, France.*

³*Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, Besançon, France.*

⁴*INSERM U837, CHRU Lille, IRCL Laboratoire d'Hématologie, Centre de Biologie Pathologie, Lille, France.*

⁵*Department of Pathology, University of Montréal, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, QC, Canada*

⁶*Laboratoire de Génétique biologique, CHU Besançon, Besançon, France.*

⁷*Laboratoire d'Hématologie A, Centre de Biologie Pathologie, Boulevard du Pr Leclercq, 59037 Lille, France*

⁸*Service Hématologie, CHU Besançon, Besançon, France.*

⁹*Service d'Hématologie biologique, CHU La Milétrie, Poitiers, France.*

¹⁰*Laboratoire du Groupe Hospitalier de La Rochelle-Ré-Aunis, CH de La Rochelle, La Rochelle, France.*

¹¹*Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France.*

¹²*Service d'Hématologie Clinique, Sorbonne Université, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France.*

¹³ *Département d'Hématologie biologique, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Créteil, France.*

¹⁴ *Laboratoire d'Hématologie, CHU de Caen Normandie, Normandie Université, UNICAEN, Caen, France.*

¹⁵ *Laboratoire d'hématologie, CHU Dupuytren, avenue Martin Luther King, Limoges, France.*

¹⁶ *Laboratoire d'Hématologie et Consultations d'Hématologie Biologique, Hôpital Universitaire Carémeau, Nîmes, France.*

¹⁷ *Service d'Hématologie, Groupe Hospitalier de la région Mulhouse Sud Alsace, Mulhouse, France.*

¹⁸ *Laboratoire d'Hématologie, CHRU Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, 67098 Strasbourg, France.*

¹⁹ *Laboratoire d'hématologie et auto-immunité, Hôpital de Mercy, CHR de Metz-Thionville, France.*

²⁰ *Service d'hématologie de l'hôpital de Mercy, CHR de Metz-Thionville, France.*

²¹ *Laboratoire d'hématologie, Hôpital Pasteur, Nice, France.*

²² *Laboratoire d'hématologie, CH du Mans, Le Mans, France.*

²³ *Service Hématologie, CNRS UMR7365, Biopôle Université de Lorraine, CHRU Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France.*

²⁴ *Laboratoire d'immunologie, CHU Grenoble, La Tronche, France.*

²⁵ *Service de Biologie Médicale, Centre Hospitalier de Versailles A. Mignot, Le Chesnay, France.*

Running Heads: Frequent *RUNX1* mutations in acute leukemia + pDC

Contact information for correspondences:

Prof. Francine Garnache Ottou, UMR1098, Laboratoire Hématologie, EFS/B-FC, 8 rue Dr JFX Girod, 25020 Besançon, France. Phone: Tel: +33(0)3.81.615.615, Fax: +33(0)3.81.615.617, E-mail: francine.garnache@efs.sante.fr

Word Count

Abstract: 249/250

Main text: 3600/4000

Methods: 499/500

Figures: 5

Tables: 1

Supplemental Files: 1

References: 50/50

Acknowledgments

The authors would like to thank Hugues Faucheu for helping on the design panel, Véronique Yerly-Motta for helping on the NGS platform and Fiona Ecartot for English proofreading. This work was supported by Ligue régionale contre le Cancer (CCIRGE-BFC-2016), Fondation ARC (Aides Individuelles DOC20170505805) and Association Laurette Fugain (ALF 2018/08).

Authorship and disclosures

FGO designed the study. FGO and FR supervised the study. ED, ED, SB, ED, VB, MLG, DRW, OWB, VS, JF, SB, BD, CMR, PO, VD, MT, JR, MTR, MCJ, VR, ES and FGO procured patient specimens. SB performed cell sorting. TP performed anatomopathological analysis and MACR cytogenetics analysis. LZ, FR and LS performed the molecular experiments. PJV provided assistance in bioinformatics analysis. LZ and FR analyzed NGS data. FR performed statistical analysis. LZ, FR and FGO wrote the original manuscript. CP, CR, MC, FAD, SG, FJ, CF, PS and OA revised the manuscript and provided guidance and expertise. All authors provided input and approved the final version of the manuscript. The authors declare no competing financial interests.

ABSTRACT

Neoplasms involving plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) include Blastic pDC Neoplasms (BPDCN) and other pDC proliferations, where pDCs are associated with myeloid malignancies: most frequently Chronic MyeloMonocytic Leukemia (CMML) but also Acute Myeloid Leukemia (AML), hereafter named pDC-AML. We aimed to determine the reactive or neoplastic origin of pDCs in pDC-AML, and their link with the CD34⁺ blasts, monocytes or conventional DCs (cDCs) associated in the same sample, by phenotypic and molecular analyses (targeted NGS, 70 genes). We compared 15 pDC-AML at diagnosis with 21 BPDCN and 11 normal pDCs from healthy donors. CD45^{low} CD34⁺ blasts were found in all cases (10-80% of medullar cells), associated with pDCs (4-36%), monocytes in 14 cases (1-10%) and cDCs (2 cases, 4.8-19%). pDCs in pDC-AML harbor a clearly different phenotype from BPDCN: CD4⁺ CD56⁻ in 100% of cases, most frequently CD303⁺, CD304⁺ and CD34⁺; lower expression of cTCL1 and CD123 with isolated lymphoid markers (CD22/CD7/CD5) in some cases, suggesting a pre-pDC stage. In all cases, pDCs, monocytes and cDC are neoplastic since they harbor the same mutations as CD34⁺ blasts. *RUNX1* is the most commonly mutated gene: detected in all AML with minimal differentiation (M0-AML) but not in the other cases. Despite low number of cases, the systematic association between M0-AML, *RUNX1* mutations and an excess of pDC is puzzling. Further evaluation in a larger cohort is required to confirm *RUNX1* mutations in pDC-AML with minimal differentiation and to investigate whether it represents a proliferation of blasts with macrophage and DC progenitor potential.

MAIN TEXT

INTRODUCTION

Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) are hematopoietic cells mainly developed from a myeloid branch including the Macrophage DC Progenitor (MDP) with monocyte, conventional DC (cDC) and pDC differentiation potential¹⁻⁴. Two types of neoplastic counterparts for pDC have been identified: the first is the well-known Blastic pDC Neoplasm (BPDCN), initially described as CD4⁺ CD56⁺ neoplasm⁵⁻¹⁰; and the second is defined as Mature pDC Proliferation (MPDCP) associated with a myeloid neoplasm, frequently Chronic MyeloMonocytic Leukemia (CMML), but also MyeloDysplastic Syndrome (MDS) or Acute Myeloid Leukemia (AML), especially with monocytic differentiation¹¹⁻¹⁷. MPDCP is not formally referenced in the WHO 2017 classification, but mentioned as a differential diagnosis of BPDCN^{7,8}. As for BPDCN, MPDCP occur predominantly in male patients (75%) with a median age of 69 years¹⁸ and frequent lymph nodes or skin lesions. The mature pDC denomination refers to the morphologically mature and CD56⁻ phenotype (as with normal pDCs), in the absence of the blastic morphology of BPDCN⁸. Flow cytometry or immunohistochemistry are mandatory for BPDCN diagnosis and relatively well defined with CD4⁺, CD56⁺, CD123^{high}, CD303^{+/}, CD304^{+/} cells^{7,19} expressing TCL1 at high levels²⁰. Conversely, only few cases of MPDCP phenotype have been described^{7,14,15}. In the same way, the genomic profile of MPDCP is still poorly understood, but a clonal relationship between pDC and the associated neoplasm has been demonstrated with pDCs exhibiting leukemic abnormalities such as monosomy 7, trisomy 8, del(5q), *CBFB-MYH11* or internal tandem duplication of *FLT3* (*FLT3-ITD*) of blasts in AML^{16,17,21-23} and the mutational profile of monocytes in CMML²⁴.

We collected AML harboring a heterogeneous phenotypic presentation with a population of immature blasts associated with an excess of pDCs, but also monocytes and sometimes cDCs. These cases are hereafter referred to as AML with pDC (pDC-AML). The purpose of this study was to better characterize pDC-AML by analyzing the phenotype of immature blasts and pDCs and the mutational profiles of each cell population (blasts, pDCs, monocytes, cDCs) after cell sorting, in order to determine whether they share the same profiles.

METHODS

PATIENT SAMPLES

Primary cells are routinely referred to our center for BPDCN suspicion with cytologic and phenotypic arguments in peripheral blood (PB) or bone marrow (BM) (collection DC 2016-27 91). Some cases do not meet the criteria for a BPDCN diagnosis, based on the WHO classification 2017^{5,8}. Especially, 15 cases were collected based on the association of CD34⁺ blasts of myeloid origin and pDCs (Table 1). All cases were analyzed at diagnosis, except for N35 (Day 81 post-induction). The analysis was performed on BM aspiration (n=12) or PB (n=3). BM biopsies were rarely available, preventing from anatomopathology analysis. Fifteen normal BM aspiration performed for peripheral thrombopenia/research of metastatic infiltration, 10 PB from healthy donors and 21 previously described cases of BPDCN²⁰ were used as controls after written informed consent. This study was approved by the Besançon ethics committee (CPP-Est II, Besançon, France)²⁰.

IMMUNOPHENOTYPE

Flow cytometry was performed using a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) with DIVA 6.2 software (BD Biosciences) after cell labelling with monoclonal antibodies (*Online Supplementary Table S1*). The Mean Fluorescence Intensity Ratio (MFIR) of cTCL1 was obtained by dividing the Mean Fluorescence Intensity (MFI) for cTCL1 by that of the isotype control mAb. Cells were considered positive for cTCL1 expression when MFIR was greater than 2. Isotype control was not used for MFIR of CD123 because of its high expression on pDCs; thus MFIR was calculated by dividing the MFI of CD123 on pDC by that on lymphocytes.

CELL SORTING

One to 10 million cells were sorted using an ARIA III FACS (Becton Dickinson Biosciences) after cell labelling with monoclonal antibodies (*Online Supplementary Table S1*) in order to select the populations of interest: T-cells (CD45^{high}, CD3⁺), immature blasts (CD34⁺, CD303⁻), pDCs (CD123^{high}, CD303⁺), monocytes (CD14⁺ or CD64⁺, CD123^{low}, CD303⁻) and cDC (CD34⁻, CD1c⁺, CD303⁻).

MOLECULAR BIOLOGY

Whole Genome Amplification was carried out using the REPLI-g® Single Cell kit (Qiagen Hilden, Germany), as recommended by the manufacturer. Next Generation Sequencing (NGS) was performed, from a HaloPlex^{HS} Target

Enrichment System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) targeting 70 genes (*Online Supplementary Table S2*), in paired-end, 2x150 cycles on a MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

BIOINFORMATICS ANALYSIS

Raw data were analyzed using in-house bioinformatics pipelines (*Online Supplementary Methods*) with annotation of the variants via GenerateReports^{TM25} yielding Variant Call Files. Finally, several filters were applied to eliminate intronic regions, synonymous mutations and polymorphisms.

STATISTICS

Statistical analyses were performed using Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The distribution of MFIR was studied using the D'Agostino-Pearson normality test. Quantitative data were compared using ANOVA. Patient groups were compared using the Mann-Whitney non-parametric test for quantitative variables with a non-Gaussian distribution, the Student t test for normally distributed variables or the Chi-square test with Yates' continuity correction for categorical variables. Correlations between quantitative variables were investigated by linear regression analyses. All statistical tests were two-sided, with a 5% alpha risk. Results are expressed as median [range].

Further details in the *Online Supplementary Appendix*.

RESULTS

PATIENTS

Fifteen patients were included, mainly elderly men with a median age of 70 years [52-87] and a sex ratio of 4:1 (Table 1). Cytological analysis of BM aspiration, associated with phenotypic data, found 11 cases of AML with minimal differentiation (M0-AML in FAB classification) with a prior history of cytopenia in one of them; one AML without maturation (AML-1); 2 acute myelomonocytic leukemia (M4-AML) with a prior history of CMML; and one M5-AML secondary to another MyeloDysplastic Syndrome/MyeloProliferative Neoplasm (MDS/MPN) analyzed during progression under induction treatment. On BM aspiration, blast cells were observed in all cases, associated with pDCs, described as smaller with a more mature chromatin, faint basophilic cytoplasm without granulation, sometimes small vacuoles and short pseudopodia (Figure 1A-C). Lymph node involvement was reported in one patient, and skin lesions in 4 other patients (26.7%). Pathology analysis of skin lesions found myeloblast infiltration

without pDCs in patients N2 and N8, and pDC proliferation in patients N9 and N11. No clonal aberration was detected on karyotype for 9 cases, while 3 others had trisomy 13 (N1, N9 and N11), 2 had chromosome 7 defects (N14, N16), and one had Y loss (N20). Two patients with normal karyotype were rearranged for *KMT2A* (N8, N35), and a deletion of *EZH2* was detected by FISH in patient N16.

IMMUNOPHENOTYPE IDENTIFIED DIFFERENT SUBPOPULATIONS IN PATIENTS

In contrast to BPDCN, cells of interest were heterogeneous, with a significant population of CD45^{low} CD34⁺ immature myeloid blasts (44%, [10-80]) without markers of pDC commitment on the one hand, and an excess of CD4⁺ CD123⁺ HLA-DR⁺ cTCL1⁺ CD303⁺ pDCs (15%, [4-36]) on the other hand. Consequently, these cases more likely fit the description of pDC-AML (or MPDCP associated with AML according to the WHO classification⁸) where pDC were in excess, greater than 4% (median 15%) in our cohort. Indeed, a median of 0.25% of total nucleated cells was detected for the pDC contingent in 15 normal BM aspiration and 0.24% in PB, with similar ranges [0.02-0.95%] and [0.17-0.53%], respectively. For 11/15 AML cases (73%), CD45^{low} CD34⁺ immature blasts were more frequent than pDCs, whereas pDCs were preponderant in the remaining 4 cases [10-26%]. Monocytes (3% [1-10]) were also found in 14 cases, greater in acute myelomonocytic leukemia (M4-AML) than in other cases. Interestingly, cDCs were detected in patients N7 and N8 (4.8% and 19% of cells respectively) (Figure 2).

The CD45^{low} immature blasts were CD34⁺ (15/15, 100% of cases), CD117⁺ (11/15; 73%), TdT⁺ (5/9; 56%), expressed myeloid markers such as CD13 (11/15, 73%) (Figure 1D,E) and/or CD33 (5/15, 33%); and less frequently CD15/65 (2 cases) or myeloperoxidase (1 case). Monocyte lineage markers were only expressed on blasts of M4/5-AML patients. T-cell markers were expressed in 2 cases (CD7 +/- CD5: patients N2 and N20) and the B-cell marker CD22 in 2 other cases (N7 and N14) which was not sufficient to meet the definition of mixed-phenotype acute leukemia, as CD3/cCD3 or CD19/cCD79a were not expressed (Figure 2). CD123 was expressed in 12 cases/15 (80%) at low level (MFIR: 15.58 [2.5-63.1], MFI: 2309 [465-8674]). In 2 cases, blasts expressed CD4, whereas CD56 was never expressed. The blastic population did not express markers strongly associated with the pDC (cTCL1, CD303 and CD304) or cDC (CD1c, CD11c) lineages.

Associated pDCs were constantly CD123^{high}, CD4^{+/+low} and CD303⁺ (100%), with CD304 expression in most cases (13/15, 87%) and none of them expressed CD56. The immaturity marker CD34 was expressed in 33% of cases,

whereas TdT in only 1 case out of 9 tested. The CD123 expression level was significantly higher on pDCs than on the immature CD34⁺ blasts (MFIR: 172.9 [12.5-482.6] versus 15.58 [2.5-63.1] on CD34⁺ blasts, $p < 0.0001$; MFI: 20836 [10755-45746] versus 2309 [465-8674] on CD34⁺ blasts, $p < 0.0001$) (Figure 3A,B). cTCL1 was expressed in pDCs (9/12 cases, 75%) at a statistically lower level (MFIR:5.3 [0.6-22.6]; MFI:2473 [487-20684]) than in the 21 BPDCN cases (MFIR:34 [6.0-96.0], $p < 0.0001$; MFI:13990 [2186-125568], $p = 0.0006$) and even than in normal pDCs (MFIR:16.9 [3.5-45.5], $p = 0.0052$; MFI:8106 [3389-31544], $p = 0.0192$) (Figure 3C,D).

Interestingly, 4 patients with M0-AML expressed myeloid, B-cell or T-cell markers on both CD34⁺ blasts and pDCs, but with partial and lower expression on pDCs than on CD34⁺ blasts: CD33 and CD22 for N7, CD13 for N1, CD33 for N36, CD5 and CD7 for N20 (Figure 2). A maturation continuum between immature blasts and pDCs was observed in some cases (Figure 1D).

cDCs were identified by the expression of CD1c and CD11c without CD14 and CD64 expression in patients N7 and N8, and were sorted for molecular studies for patient N8 only.

MUTATIONAL PROFILE

The purity of each sorted fraction is depicted in *Online Supplementary Table S3*. The NGS panel was informative for all cases, with a number of detected mutations ranging from 2 to 6. Fourteen genes were found to be mutated among the 70 explored (Figure 4), corresponding to transcription factors *RUNX1* (11/15, 73%); epigenetic modifiers *ASXL1* (5/15, 33%), *EZH2* (3/15, 20%), *TET2* (4/15, 27%), *DNMT3A* (3/15, 20%); genes involved in splicing *SRSF2* (5/15, 33%), *SF3B1* (2/15, 13%), *U2AF1* (1/15); RAS pathway *CBL* (3/15, 19%), *KRAS*, *PTPN11* (1/15 each); cytokine signaling *FLT3* (3/15, 19%) as well as other genes, such as *PFH6* and *WT1* (1/15 each) (*Online Supplementary Table S4*). Of note, only one case was mutated for *NPM1* (patient N35) and none for *CEBPA*. In BPDCN, 17 out of the 21 of the cohort were studied by NGS, with 0 to 5 mutations per case on 17 genes: *TET2* (9/17, 53%), *ASXL1* (6/17, 41%), *ZRSR2* (4/17, 24%), *TP53* (3/17, 18%), *IKZF1*, *NRAS*, *SRSF2*, *IDH1* (2/17 each, 12%), *ZEB2*, *MET*, *ETV6*, *ATM*, *IKZF3*, *CXCR4*, *NOTCH2*, *KRAS*, *JAK2* (1/17 each) (Figure 4).

Mutations were systematically found in sorted CD34⁺ immature blasts, pDCs, monocytes and cDCs of the same sample, and were not detected in the T-cell fraction, thus confirmed to be a non-neoplastic subpopulation (Figure 4). Variant Allele Frequencies (VAF) were quite similar between cell fractions. However, VAFs of the monocyte

subpopulation were lower than in blasts and pDCs in 2 cases (N13 and N36), which may indicate that this mutation is subclonal in monocytes (N13) or that there is a mixture of neoplastic and reactive non-neoplastic monocytes (same VAF difference in all detected mutations for N36). Some mutations were subclonal in both blast and monocyte fractions: *KRAS* for N19, *FLT3* for N20 (Figure 4). Overall, the most frequently mutated genes were the transcription factor *RUNX1*, splicing genes (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*) and epigenetic modifiers *DNMT3A* and *TET2*. Interestingly, *RUNX1* mutations concerned all M0-AML, while none of the other cases were mutated (M4/5-AML and M1-AML). Consequently, despite low number of cases, there was a significant association between the M0-AML subtype and *RUNX1* mutations (Chi-square with Yates' correction, $X^2=10.32$, 1df, p-value=0.0013). The majority of *RUNX1* mutations detected were frameshift (n=6) or stop gain (n=3), with a biallelic invalidation in patient N13. *RUNX1*-mutated cases involved mainly males (M/F=8/3), with a median age of 70 years [55-87].

DISCUSSION

The WHO 2017 classification clearly recognizes BPDCN as a form of pDC neoplasm, while MPDCP is still insufficiently described and probably under-diagnosed⁸. MPDCP mainly concerns CMML and more rarely MDS or AML. Our study focused on pDC-AML, using a phenotypic and mutation characterization on sorted population of 15 cases. Our gateway for the inclusion of cases is the pDC-like morphology of some blastic cells detected by cytologists in French hospitals. This point precludes us from determining the prevalence of pDC-AML among AML, due to a recruitment bias. We highlight in this study an excess of pDCs in a context of AML in order to differentiate them from BPDCN and to precise their molecular profile, not well-described so far. The clinical presentation of our cohort was close to that of BPDCN, with elderly patients and a clear male predominance, but skin lesions were less frequent (25% of cases vs 90% in BPDCN), linked to either pDC (2 cases) or myeloblast (2 cases) infiltration. The excess of pDCs in BM aspiration of pDC-AML was well over the pDC infiltrate in healthy donor BM and PB, considered to be below 1% of total nucleated cells^{24,26,27} and confirmed by our data. Moreover, pDCs are frequently gathered on BM smears, compatible with aggregates and in the only case of BM biopsy, clustered nodules of pDC were present, as reported by pathologists with islands of pDCs in MPDCP^{13,21,24}. In the two cases with prior history of CMML, pDCs were not in high excess prior transformation on bone marrow smears. However, in the absence of available sample, flow cytometry assays were not assessed at the CMML stage.

Blasts exhibited an immature phenotype with expression of CD34, CD117 and TdT, which distinguishes these cases from BPDCN. They also frequently express myeloid markers, and the expression of CD123 is definitely weaker than pDCs from the same samples or pDC blasts from BPDCN. Of note, strong pDC or cDC lineage markers (CD303, CD304, cTCL1, ILT7 and CD1c, CD141, CD11c) were never expressed on blasts. Focusing on the 11 M0-AML cases, blasts are immature with markers of commitment to the myeloid lineage (CD13, CD33 without MPO) plus expression of lymphoid markers in some cases; this could be a sign of an original progenitor origin or oncogenic dysregulation in pDC-AML compared to other AML.

Only 4 cases of pDC-AML showed higher infiltration of pDC than blasts: 3 at diagnosis (N2, N8 and N34) and the fourth at day 81 post-induction (N35). In these 15 cases, the phenotype of pDCs is different from pDCs in healthy donors and in BPDCN. CD56, is not expressed in our 15 cases, similarly to physiological mature pDCs, only CD56⁺ when stimulated by Flt3L during maturation^{28,29}. Conversely CD56 is almost systematically expressed in BPDCN^{5,30,31}, except for rare cases³²⁻³⁴. Moreover, the pDCs in pDC-AML always expressed CD303 (100%) while 20 to 30% of BPDCN are CD303⁻^{6,31} and BPDCN express a lower intensity of CD303 than pDC of pDC-AML (data not shown); cTCL-1 expression was substantially lower on pDCs of pDC-AML compared to pDCs of BPDCNs and even pDCs of healthy donors (Figure 3B). Finally, CD34 is sometimes expressed on pDCs (33% of cases), whereas CD34 is almost never expressed on BPDCN blasts. This phenotype is closer to normal pDCs in some respects (CD56⁻, CD303⁺, cTCL1^{low}). pDC lineage maturation is divided in 3 stages with progressive acquisition of CD303 and CD304 plus downregulation of CD34 and CD117 and gradual loss of CD13, CD33 or CD22 expression³⁵. In our series, the expression of CD34 (6 cases) and CD13, CD33 or CD22 (3 cases) makes these pDCs closer to the intermediate stage of pDC maturation (CD34⁺, CD303⁺, CD304^{+/-}, CD123⁺). Moreover, aberrant markers of myeloid or lymphoid lineage (CD13, CD33, CD11b, CD22, CD7, CD5) on both blasts and pDCs in the same patient support the idea of a common origin of these populations, with maturation of CD34⁺ blasts towards the pDC lineage by downregulation of CD34 and upregulation of CD123, CD303 and CD304. Reinforcing this hypothesis, we clearly show a maturation continuum between blasts and pDCs or monocytes (Figure 1D) with CD34 downregulation and upregulation of CD45, pDC markers (CD123, CD304, CD303) on the pDC cells or CD14, CD64 on monocytes, as recently highlighted^{14,15}. Another study also described similar cases of leukemia associating immature CD34⁺ myeloid blasts and CD34^{+/-} CD56⁻ pDCs, but consider these cases as an immature subgroup of BPDCN³⁶. Altogether, a variety of teams described similar cases under different denominations: MPDCP

with myeloid neoplasm (MN), pDC proliferations associated with MN, AML/MN with pDC differentiation, AML/MDS-pDCs, leukemia of ambiguous lineage, or immature Group 1 of BPDCN^{14–17,22,23,36,37}. There is a need to refine this poorly defined MPDCP, where the “mature” denomination should be omitted because only referring to the absence of the blastic morphology of BPDCN⁸.

Our data and others highlight that pDCs are present at all stages of maturation in pDC-AML, even CD34⁺, because they would keep their potential for maturation^{14,15} as already described in pDC-CMML²⁴. In addition, pDC-AML appear to be quite similar to pPDC-CMML, as clonal monocytes are also frequently detected in our cohort (14/15 AML). In this regard, all cases of MPDCP described so far fall within our definition of pDC-AML/CMML/MDS. Interestingly, the expression of CD123 on both blasts and pDCs opens up the potential to use new therapies targeting CD123, such as tagraxofusp, IMG632 or CD123 CAR-T cells^{38–41}. Crucially, these pDC-AML may respond differently from other AML or BPDCN.

Very few molecular data have been obtained to assert the clonal link between pDCs and leukemic cells in CMML and AML^{21–23}. In our series, using sorted cell populations, we show that the same mutations are shared by blasts, pDCs, monocytes and even cDCs, thus confirming the neoplastic origin of pDCs and their shared clonal origin with blasts, monocytes and cDCs (for one tested case). Of note, no unique mutation was identified in pDCs but not in the blast compartment, or *vice versa*, albeit with the limitation that only 70 genes were tested. Thus, no specific mutation arising during the lineage commitment was highlighted. Blasts seem to be broadly blocked in an immature undifferentiated stage in pDC-AML compared to pDC-CMML, and maintain their ability to mature towards pDCs, monocytes or even cDCs (Figure 5A-B). The immature CD34⁺ blasts could be a proliferation, at the very least, of a bipotent progenitor with DC (pDC and cDC) and monocyte potential such as the MDP. The expression of CD22, CD2 and CD5 on pDCs and blasts in some cases could also suggest that they derive from a granulocyte-monocyte-lymphoid progenitor or from AXL⁺ SIGLEC6⁺ DCs, recently identified⁴².

The mutation status obtained does not highlight specific genes for all cases. Many of them are frequently mutated in other myeloid malignancies, involved in epigenetics (*ASXL1* and *TET2*), splicing (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*) or the RAS pathway (*CBL*, *KRAS*, *PTPN11*). This mutation profile is only partially similar to BPDCN, because BPDCN can also be mutated for *ETV6*, *TP53*, *ZEB2*, *MET*, *ATM*, *IKZF3*, *JAK*, *NOTCH2* and *CXCR4*, plus *TET2* with a high frequency (Figure 4). Cases classified as M4/5-AML were always transformations of MDS/MPN and had a similar molecular

profile including *ASXL1*, *TET2*, *SRSF2*, *CBL* or *PTPN11* mutations, sometimes with additional mutations responsible for acute transformation (*NPM1* mutation for N35). Remarkably, *RUNX1* is the most frequently mutated gene in pDC-AML (73% of cases), as already described¹⁷. Moreover, it only concerned M0-AML cases in our study and all cases of M0-AML exhibit this mutation (100%). This point is particularly puzzling considering that this prevalence is markedly different from the described epidemiology of 20-30% of *RUNX1* mutations in M0-AML^{43,44} and knowing that *RUNX1* mutation has only been reported once in BPDCN⁴⁵. Although, this study only concerns a small number of cases and the recruitment bias precludes us from determining the frequency of M0-AML and *RUNX1* mutations in pDC-AML. Our 11 PDCP-M0-AML cases were 71 years old on average, with a M/F sex ratio of 2.67, consistent with the *RUNX1*-mutated AML provisional entity^{8,43}. Unfortunately, given the advanced age of patients with palliative care and low number of cases, prognostic conclusions are impossible. *RUNX1* mutations were not detected in the non-neoplastic T-cell fraction, demonstrating that these mutations are somatic. WGA prevented us to definitely obtain copy number variations, but VAF were higher than 50% for 6 patients (N8, N9, N11, N12, N16, N19) and a seventh (N13) was double mutated for *RUNX1*, suggesting secondary alteration of *RUNX1*, as already described⁴⁶.

Notably, inhibition of *RUNX1* is considered to increase *RUNX2* and *RUNX3* protein levels, following a complementary compensation mechanism that maintains the entire *RUNX* family at a constant level⁴⁷. Then, *RUNX1* invalidation could promote a *RUNX2* switch and then a pDC commitment because *RUNX2* plays a crucial role in pDC differentiation^{48,49}. Further experiments are nevertheless required to confirm this hypothesis.

To conclude, our study identifies a group of pDC-AML requiring a differential diagnosis with BPDCN. They are characterized by an immature myeloid population ($CD34^+$, $CD117^{+/-}$ $CD123^{+low}$ without expression of pDC markers) associated with an excess of pDCs ($CD123^{+high}$, $CD4^+$) that clearly differ from BPDCN neoplastic cells by no expression of CD56, the possible expression of CD34, higher expression of CD303 and lower expression of cTCL1. Molecular data show that these pDCs are neoplastic and not reactive, and the mutational landscape of pDC-AML appear distinct from BPDCN, notably with frequent *RUNX1* mutations. Moreover, a continuous maturation pattern suggests that these pDCs as well as monocytes could arise from the immature $CD34^+$ blasts, potentially with MDP properties (Figure 5B). Finally, this study addresses (i) the frequency with which *RUNX1*-mutated AML are associated with an excess of

pDCs, (ii) the type of progenitors involved and (iii) its prognostic or therapeutic impact. These questions warrant investigation in an independent and larger cohort of AML.

Note Added in Proof: during the review process of our manuscript, Xiao *et al.* also specifically described pDC-AML with frequent *RUNX1* mutations and an original pDC transcriptional program, in approximately 5% of AML (Xiao W, Chan A, Waarts MR, et al. Plasmacytoid dendritic cell expansion defines a distinct subset of RUNX1 mutated acute myeloid leukemia. Blood [Epub ahead of print], PMID: 32871587). Our work and this independent study argue for pDC-AML to be a distinct entity within AML, with potential therapeutic impact.

REFERENCES

1. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767–811.
2. Jegalian AG, Facchetti F, Jaffe ES. Plasmacytoid dendritic cells: physiologic roles and pathologic states. *Adv Anat Pathol* 2009;16(6):392–404.
3. Naik SH, Sathe P, Park H-Y, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 2007;8(11):1217–1226.
4. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 2007;8(11):1207–1216.
5. Chaperot L, Bendriss N, Manches O, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2001;97(10):3210–3217.
6. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, et al. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia. *Br J Haematol* 2009;145(5):624–636.
7. Facchetti F, Cigognetti M, Fisogni S, Rossi G, Lonardi S, Vermi W. Neoplasms derived from plasmacytoid dendritic cells. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2016;29(2):98–111.
8. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2017.
9. 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.
10. Petrella T, Facchetti F. Tumoral aspects of plasmacytoid dendritic cells: what do we know in 2009? *Autoimmunity* 2010;43(3):210–214.
11. Vitte F, Fabiani B, Bénet C, et al. Specific skin lesions in chronic myelomonocytic leukemia: a spectrum of myelomonocytic and dendritic cell proliferations: a study of 42 cases. *Am J Surg Pathol* 2012;36(9):1302–1316.
12. Dargent J-L, Delannoy A, Pieron P, Husson B, Debecker C, Petrella T. Cutaneous accumulation of plasmacytoid dendritic cells associated with acute myeloid leukemia: a rare condition distinct from blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *J Cutan Pathol* 2011;38(11):893–898.
13. Orazi A, Chiu R, O’Malley DP, et al. Chronic myelomonocytic leukemia: The role of bone marrow biopsy immunohistology. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2006;19(12):1536–1545.
14. Hamadeh F, Awadallah A, Meyerson HJ, Beck RC. Flow Cytometry Identifies a Spectrum of Maturation in Myeloid Neoplasms Having Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation. *Cytometry B Clin Cytom* 2020;98(1):43–51.

15. Huang Y, Wang Y, Chang Y, et al. Myeloid Neoplasms with Elevated Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation Reflect the Maturation Process of Dendritic Cells. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2020;97(1):61–69.
16. Wang P, Feng Y, Deng X, et al. Tumor-forming plasmacytoid dendritic cells in acute myelocytic leukemia: a report of three cases and literature review. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10(7):7285–7291.
17. Xiao W, Goldberg AD, Famulare C, et al. Acute Myeloid Leukemia with Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation: Predominantly Secondary AML, Enriched for RUNX1 Mutations, Frequent Cross-Lineage Antigen Expression and Poor Prognosis. *Blood* 2018;132(Supplement 1):2789.
18. Bodmer A, Menter T, Juskevicius D, et al. Sharing of a PTPN11 mutation by myelodysplastic bone marrow and a mature plasmacytoid dendritic cell proliferation provides evidence for their common myelomonocytic origin. *Virchows Arch Int J Pathol* 2017;470(4):469–473.
19. Horny HP, Feller AC, Horst HA, Lennert K. Immunocytology of plasmacytoid T cells: marker analysis indicates a unique phenotype of this enigmatic cell. *Hum Pathol* 1987;18(1):28–32.
20. Angelot-Delettre F, Biichle S, Ferrand C, et al. Intracytoplasmic detection of TCL1--but not ILT7-by flow cytometry is useful for blastic plasmacytoid dendritic cell leukemia diagnosis. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2012;81(8):718–724.
21. Vermi W, Facchetti F, Rosati S, et al. Nodal and extranodal tumor-forming accumulation of plasmacytoid monocytes/interferon-producing cells associated with myeloid disorders. *Am J Surg Pathol* 2004;28(5):585–595.
22. Rickmann M, Krauter J, Stamer K, et al. Elevated frequencies of leukemic myeloid and plasmacytoid dendritic cells in acute myeloid leukemia with the FLT3 internal tandem duplication. *Ann Hematol* 2011;90(9):1047–1058.
23. Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, et al. Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood* 2001;98(13):3750–3756.
24. Lucas N, Duchmann M, Rameau P, et al. Biology and prognostic impact of clonal plasmacytoid dendritic cells in chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2019;33(10):2466–2480.
25. Vially P-J, Mareschal S, Bertrand P, et al. GenerateReports: an Ion Torrent plugin summarizing a whole NGS experiment for clinical interpretation. 2015.
26. Wang W, Khoury JD, Miranda RN, et al. Immunophenotypic characterization of reactive and neoplastic plasmacytoid dendritic cells permits establishment of a 10-color flow cytometric panel for initial workup and residual disease evaluation of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Haematologica* [Epub ahead of print].
27. Xiao W, Goldberg AD, Famulare CA, et al. Loss of plasmacytoid dendritic cell differentiation is highly predictive for post-induction measurable residual disease and inferior outcomes in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2019;104(7):1378–1387.

28. Comeau MR, Van der Vuurst de Vries A-R, Maliszewski CR, Galibert L. CD123bright plasmacytoid predendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion? *J Immunol Baltim Md 1950* 2002;169(1):75–83.
29. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002;100(13):4512–4520.
30. Feuillard J, Jacob M-C, Valensi F, et al. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood* 2002;99(5):1556–1563.
31. Garnache-Ottou F, Vidal C, Biichlé S, et al. How should we diagnose and treat blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients? *Blood Adv* 2019;3(24):4238–4251.
32. Julia F, Dalle S, Duru G, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: clinico-immunohistochemical correlations in a series of 91 patients. *Am J Surg Pathol* 2014;38(5):673–680.
33. Facchetti F, Cigognetti M, Fisogni S, Rossi G, Lonardi S, Vermi W. Neoplasms derived from plasmacytoid dendritic cells. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2016;29(2):98–111.
34. Lamar E, Roggy A, Le Calvez G, et al. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm: Report of a Case with Atypical Cytology and Immunophenotype. *J Blood Disord* 2015;2(3):1033.
35. Martín-Martín L, Almeida J, Hernández-Campo PM, Sánchez ML, Lécresse Q, Orfao A. Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion (Paris)* 2009;49(8):1692–1708.
36. Martín-Martín L, López A, Vidriales B, et al. Classification and clinical behavior of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms according to their maturation-associated immunophenotypic profile. *Oncotarget* 2015;6(22):19204–19216.
37. Tsagarakis NJ, Kentrou NA, Papadimitriou KA, et al. Acute lymphoplasmacytoid dendritic cell (DC2) leukemia: results from the Hellenic Dendritic Cell Leukemia Study Group. *Leuk Res* 2010;34(4):438–446.
38. Mani R, Goswami S, Gopalakrishnan B, et al. The interleukin-3 receptor CD123 targeted SL-401 mediates potent cytotoxic activity against CD34+CD123+ cells from acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome patients and healthy donors. *Haematologica* 2018;103(8):1288–1297.
39. Kovtun Y, Jones GE, Adams S, et al. A CD123-targeting antibody-drug conjugate, IMGN632, designed to eradicate AML while sparing normal bone marrow cells. *Blood Adv* 2018;2(8):848–858.
40. Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T, et al. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;122(18):3138–3148.
41. Pemmaraju N, Lane AA, Sweet KL, et al. Tagraxofusp in Blastic Plasmacytoid Dendritic-Cell Neoplasm. *N Engl J Med* 2019;380(17):1628–1637.

42. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*;356(6335):.
43. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia* 2016;30(11):2282.
44. Roumier C, Eclache V, Imbert M, et al. M0 AML, clinical and biologic features of the disease, including AML1 gene mutations: a report of 59 cases by the Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC) and the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Blood* 2003;101(4):1277–1283.
45. 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.
46. Antony-Debré I, Duployez N, Bucci M, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016;30(4):999–1002.
47. Morita K, Suzuki K, Maeda S, et al. Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects. *J Clin Invest* 2017;127(7):2815–2828.
48. Kubota S, Tokunaga K, Umezu T, et al. Lineage-specific RUNX2 super-enhancer activates MYC and promotes the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Nat Commun* 2019;10(1):1653.
49. Chopin M, Preston SP, Lun ATL, et al. RUNX2 Mediates Plasmacytoid Dendritic Cell Egress from the Bone Marrow and Controls Viral Immunity. *Cell Rep* 2016;15(4):866–878.

Table 1. Clinical and biological features of the cohort.

Patient number	Age (y)	Gender	Material	WHO classification	FAB classification	Secondary (yes/no)	Prior therapy	Extramedullar lesions	Anatomopathology of extramedullar lesions	Karyotype	FISH <i>KMT2A</i> (11q23)	pDC contingent
N13	87	F	PB	AML with mutated <i>RUNX1</i>	M0 AML	no		no	ND	46,XX[20]	no anomaly detected	CD34 ⁺
N16*	59	M	BM	AML-MRC	M0 AML	no		no	ND	46,XY,del(7)(q36)[8]/46,XY[12]	ND	CD34 ⁺
N2	77	M	BM	AML with mutated <i>RUNX1</i>	M0 AML	no		yes/cutaneous	AML	46,XY	no anomaly detected	CD34 ⁺
N20	71	M	BM	AML with mutated <i>RUNX1</i>	M0 AML	no		no	ND	45,X,-Y[20]	no anomaly detected	CD34 ⁺
N19	70	F	BM	AML with mutated <i>RUNX1</i>	M0 AML	no		no	ND	46,XX[20]	no anomaly detected	CD34 ⁺
N8	64	M	BM	AML with <i>KMT2A(MLL)</i> rearrangement and mutated <i>RUNX1</i>	M0 AML	no		yes/cutaneous	AML	46,XY[20]	rearranged	CD34 ⁺
N1	82	F	PB	AML with mutated <i>RUNX1</i>	M0 AML	no		no	ND	47,XX,+13[13]/46,XX[7]	no anomaly detected	CD34 ⁺
N9[§]	70	M	BM	AML-MRC	M0 AML	Neutropenia and thrombocytopenia, granulocytic dysplasia [£]	Therapeutic abstention, monitoring	yes/cutaneous	pDCs	46,X,-Y,+13[11]/46,XY[23]	ND	CD34 ⁺
N11	68	M	BM	AML with mutated <i>RUNX1</i>	M0 AML	no		yes/cutaneous	pDCs	47,XY,+13[21]/46,XY[11]	no anomaly detected	CD34 ⁺
N7	79	M	BM	AML with mutated <i>RUNX1</i>	M0 AML	no		yes/lymph nodes	ND	46,XY	ND	CD34 ⁺
N12	55	M	BM	AML with mutated <i>RUNX1</i>	M0 AML	no		no	ND	46,XY[30]	no anomaly detected	CD34 ⁺
N36	52	M	BM	AML without maturation	M1 AML	no		no	ND	46,XY[28]	no anomaly detected	CD34 ⁺
N14	85	M	BM	AML-MRC	M4 AML	CMML	Therapeutic abstention, monitoring	no	ND	46,XY,-7,+mar[18]/46,XY[4]	ND	CD34 ⁺
N34[¶]	73	M	PB	AML-MRC	M4 AML	CMML	Hydroxyurea	no	ND	46,XY[20]	ND	CD34 ⁺
N35	65	M	BM	AML with mutated <i>NPM1</i> and <i>KMT2A(MLL)</i> rearrangement	M5 AML	MDS/MPN	Therapeutic abstention, monitoring	no	ND	46,XY[20]	rearranged	CD34 ⁺

BM: Bone marrow; PB: Peripheral blood; AML-MRC: AML with myelodysplasia-related changes; WHO classification: World Health Organisation classification; FAB: French-American-British classification; FISH: Fluorescent In Situ Hybridization; ND: not done. [§]pDC nodules were described on BM biopsy. [£]diagnosis of SMD was not clearly affirmed before AML state. [¶]Only patient N34 experienced a prior history of solid tumor with prostatic neoplasm treated by hormonotherapy.

Figure Legends

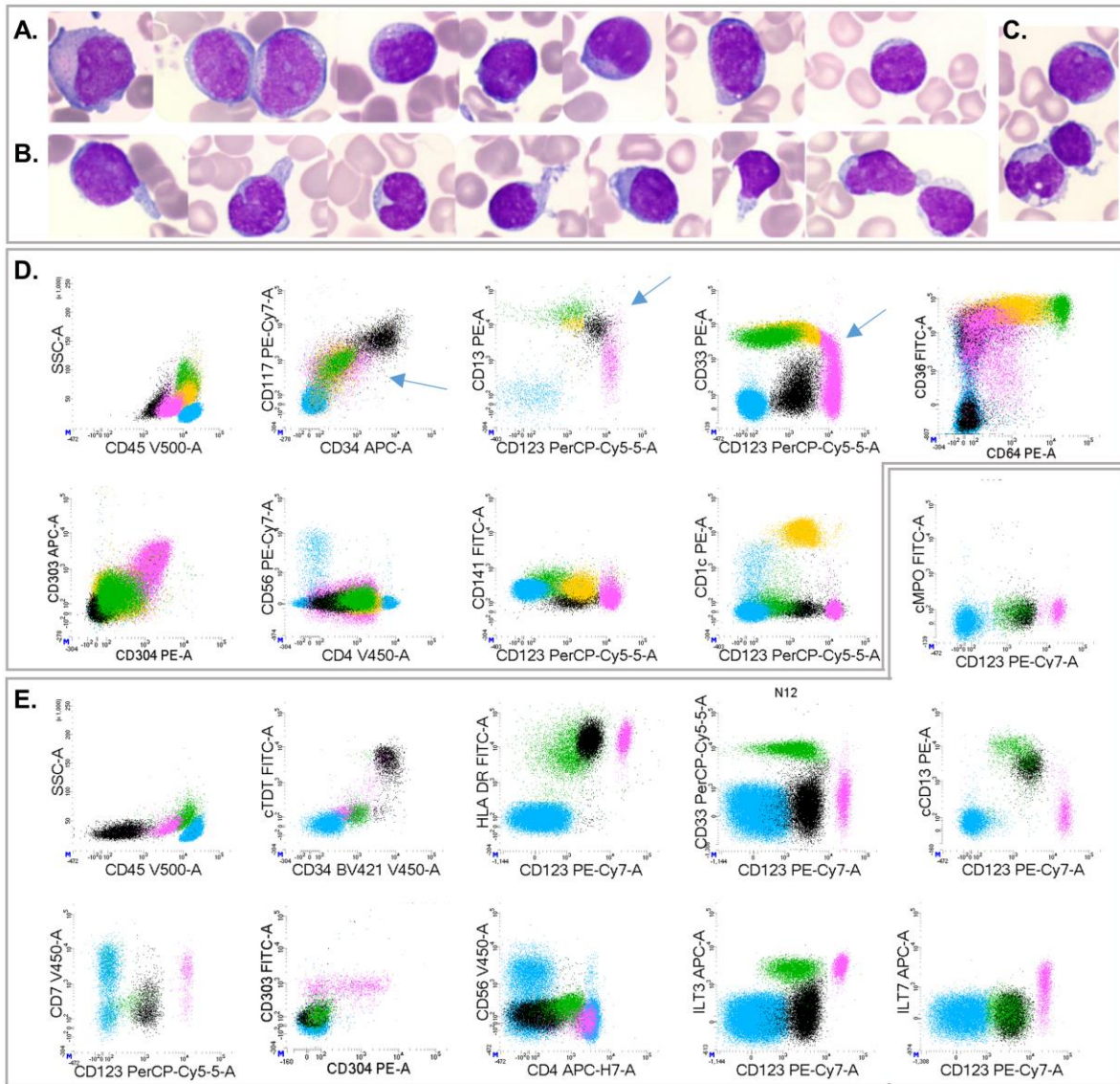


Figure 1. Morphologies and immunophenotypes of populations of interest. A,B,C. Representative morphologic aspects of peripheral blood smears from patient N1 (Magnification x1000). A: blast cells are medium sized with a high nuclear cytoplasmic ratio, fine chromatin with proeminent nucleoli. Cytoplasm is basophilic with some rare azurophilic granulations. B. pDC are smaller with more mature chromatin. The cytoplasm is less basophilic without granulation but sometimes pseudopodia and small vacuoles under the cytoplasmic membrane. C. A blast cell (top), a pDC with pseudopodia (center) and a monocyte (bottom). D,E. Representative immunophenotype after gating on FSC-A versus FSC-H plus SSC vs FSC to select singlets, leucocytes and exclude debris (not shown). Lymphocytes in blue ($CD45^{bright}/SSC^{dim}$ cells); immature blasts in black ($CD34^{+}$ cells); pDCs in pink ($CD123^{bright}$); monocytes in green ($CD123^{dim}$, $CD33^{bright}$, $CD64^{bright}$); cDCs in orange ($CD123^{+}$, $CD33^{+}$ $CD64^{dim}$). D. Patient N8: M0-AML with a continuum of phenotypic acquisition of markers (arrows) from the immature blasts: downregulation of CD13 and CD33 to pDCs or upregulation to monocytes and cDCs; downregulation of CD117 and CD34 to pDCs/monocytes/cDCs. E. Patient N12: M0-AML with Tdt⁺, HLA-DR^{bright}, CD33⁺, cCD13⁺ immature blasts; CD7⁺ CD4⁺ CD56⁻ pDCs.

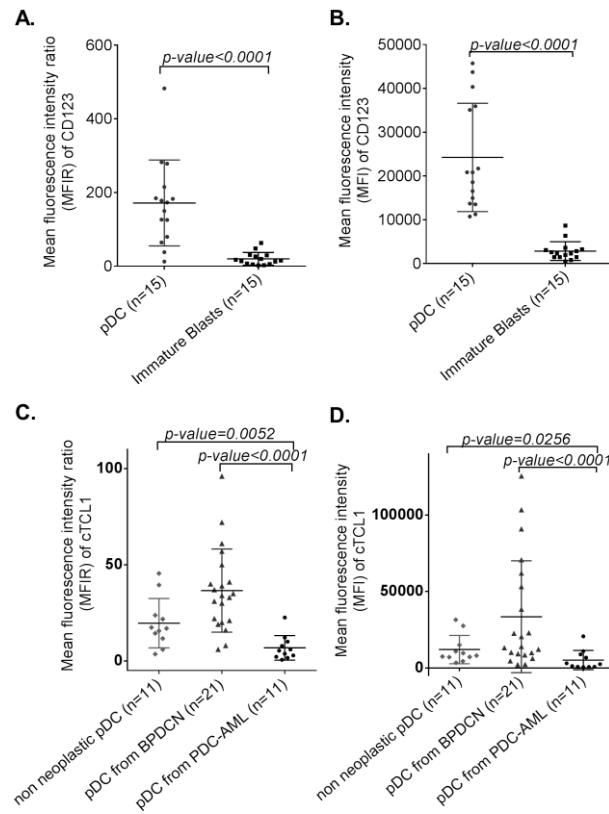


Figure 3. Expression of CD123 and cTCL1 on pDCs from pDC-AML. A. Comparison of Mean Fluorescence Intensity Ratio (MFIR) of CD123 between pDCs and immature CD34⁺ blasts in pDC-AML. B. Comparison of MFI of CD123 between pDCs and immature CD34⁺ blasts in pDC-AML. C. Comparison of MFIR of cTCL1 between pDCs from pDC-AML, BPDCN and non-neoplastic pDCs from healthy donors. D. Comparison of MFI of cTCL1 between pDCs from pDC-AML, BPDCN and non-neoplastic pDCs from healthy donors. P-values (unpaired Mann-Whitney test) are marked above.

[illegible]

Figure 4. Mutation profile of pDC-AML. Mutations detected by NGS with VAF, or Sanger sequencing (especially for *ASXL1*). Abnormalities in pDC-AML and BPDCN are depicted in: bright blue (monoallelic mutation); dark blue (biallelic mutation); white (absence of mutation); grey (not available). [‡]Percentage of cells corresponds to flow cytometry, quantification on the sample used for phenotyping, possibly diluted by PB (all cases exhibited more than 20% of blasts on BM smears). [§]Analyses performed on sample obtained after induction of chemotherapy, 70 days after diagnosis. [¶]FISH 7q36 on case N16: loss of *EZH2* in 91/200 nuclei. ***VAF not available because *ASXL1* c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12 was confirmed by Sanger sequencing.

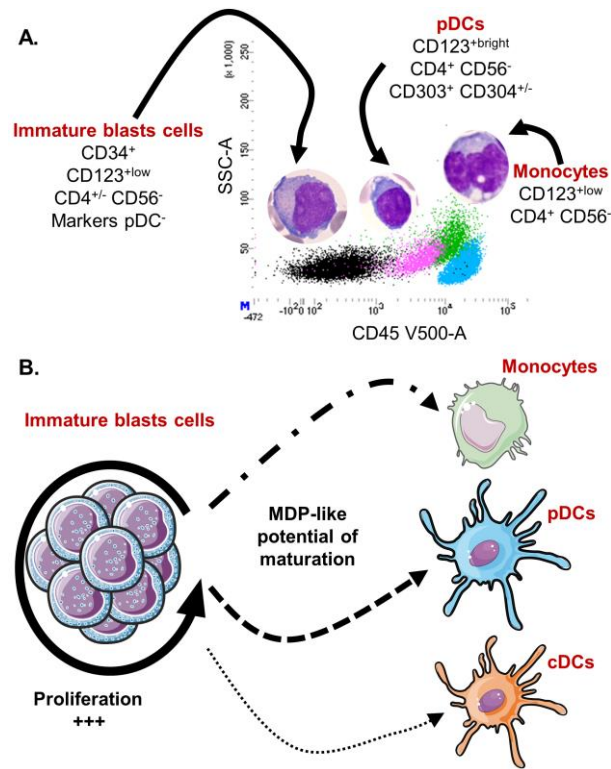


Figure 5. Maturation model in pDC-AML. A. Representative CD45/SSC dot plot of pDC-AML, with 4 populations identified: immature $CD34^+$ blasts in black, pDCs in pink, monocytes in green and lymphocyte in blue, with morphologies of these populations depicted above. B. The maturation model: immature blast cells are mainly proliferative without maturation, but at least part of them conserved MDP (Macrophage-DC Progenitor)-like potential of maturation leading to variable amounts of clonal pDCs, monocytes and cDCs.

III. Discussion

A. Profil phénotypique et potentiel de maturation

Les PPDCM ne sont pas formellement reconnues dans la classification OMS 2016. Notre étude apporte des données importantes afin de mieux différencier les PPDCM correspondant aux LAM-pDC, des LPDC. La présentation clinique peut être confondante, chez des hommes âgés avec lésions cutanées, cependant moins fréquentes que dans les LPDC (25% contre 90% dans les LPDC). Le phénotype CD34⁺ CD117⁺ TdT⁺ des myéloblastes les distingue des blastes de LPDC, ainsi que l'expression de marqueurs myéloïdes, une plus faible expression du CD123 et l'absence de marqueurs spécifiques de pDCs. L'excès de pDC présente un phénotype CD56⁻ CD303^{fort} cTCL-1^{faible} CD34^{+/-} alors que les blastes de LPDC sont classiquement CD56⁺ CD303^{faible/-} cTCL-1^{fort} CD34⁻ ^{89,92,97,98}. Ce phénotype est plus proche des pDCs physiologiques, avec cependant des caractéristiques d'immaturité en fonction des cas (33% CD34⁺), évoquant un stade II de maturation selon Martín-Martín *et al.* (CD34⁺, CD303⁺, CD304^{+/-}, CD123⁺)⁴⁶. L'apparente maturation des blastes CD34⁺ en pDCs confirme les données de la littérature et indiquerait que ces pDCs sont d'origine myéloïde^{169,170}. Nous ne pensons pas que ces cas devraient être considérés comme un sous-type de LPDC, comme précédemment suggéré^{101,279}, mais comme une hémopathie différente. En effet, l'ensemble des cas décrits jusqu'à présent rentrent dans le cadre de ces LAM avec potentiel de maturation vers la lignée pDC. L'excès de pDCs est alors plus ou moins mature et le terme de prolifération de pDCs « matures » est impropre, car il peut s'agir de pDCs de stade II de maturation. En fait, ce terme « mature » ne doit pas être compris *stricto sensu*, mais en opposition aux pDCs « blastiques » des LPDC. Les myéloblastes CD34⁺ conserveraient des capacités de maturation vers des monocytes, pDCs et même cDCs et correspondraient *a minima* à des progéniteurs bipotents à potentiel DC et monocyttaire comme les MDP (Figure 37). Le progéniteur impliqué pourrait aussi être plus en aval dans la différenciation hématopoïétique et conserver des potentialités d'engagement dans les lignées lymphoïdes B ou T, comme suggéré par certains cas de notre cohorte, de LAL-T ou de LAL-B avec excès de pDCs non présentés ici. C'est également le cas d'un patient avec LA biphénotypique myéloïde et lymphoïde B dans l'étude de Hamadeh *et al.*¹⁷⁰.

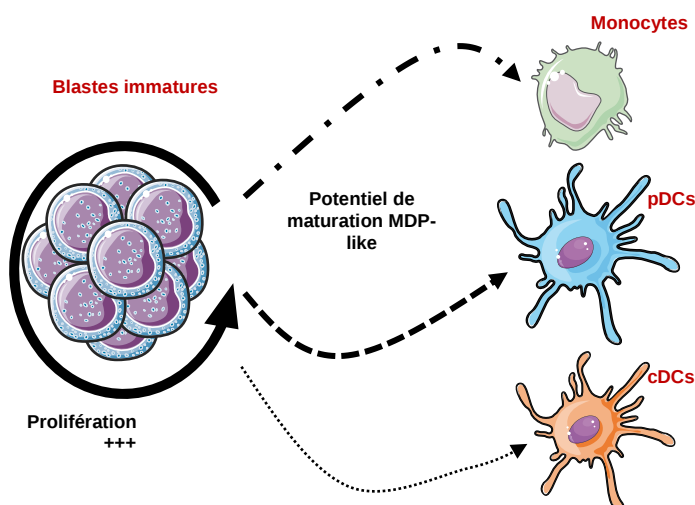


Figure 37 : Modèle de maturation des LAM-pDC

Les blastes immatures conservent un potentiel résiduel de maturation vers les pDCs, les monocytes, et les cDCs, constituant potentiellement un progéniteur macrophage-DC (MDP).

B. Mutations de *RUNX1*

De manière concomitante à notre étude, l'équipe de Ross Levine, au *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* a également publié des données primordiales pour mieux comprendre ces LAM-pDC. En effet, ils retrouvent également une fréquence élevée des mutations de *RUNX1*²⁸⁰. Cependant, cette étude ne s'est pas appuyée sur la classification FAB, et n'évoque pas d'association forte avec les LAM0, comme retrouvé pour nos patients.

Dans notre étude, ces LAM0-pDC mutées pour *RUNX1* présentent des caractéristiques cliniques en tout point similaires à celles de l'entité provisoire des LAM avec mutation de *RUNX1* (71 ans d'âge moyen, sex ratio M/F = 2,67)⁸³. Ces anomalies sont aussi fréquemment associées à des trisomies 13 et à des mutations d'*ASXL1*, comme dans notre étude^{281,282}. En revanche, nous ne retrouvons pas de trisomie 21, comme dans la littérature²⁸³. D'origine somatique, car absentes des lymphocytes T, elles n'entrent donc pas dans le cadre des mutations ou délétions germinales de *RUNX1* responsables de thrombopénies familiales avec prédisposition aux hémopathies malignes (FPD/AML pour *Familial platelet disorder with predisposition to AML*)²⁸⁴. Alors que la fréquence des mutations somatiques de *RUNX1* serait comprise entre 5 et 15% dans les LAM, avec une fréquence plus élevée de l'ordre de 25 à 30% dans les LAM0, les 11 LAM0 que nous avons étudiées sont toutes mutées^{283,285}. Ces invalidations de *RUNX1* méritent des investigations plus poussées.

En effet, le nombre de copies de *RUNX1* n'a pas pu être pleinement exploité dans notre étude, mais des anomalies bialléliques de *RUNX1* sont très probables, comme suggéré par les fréquences alléliques et la présence de doubles mutations. Sur le plan mécanistique, *RUNX1* forme avec *CBFB* le *core binding factor* (CBF)²⁸⁶, un complexe hétérodimérique clé pour l'hématopoïèse, interagissant avec *CEBPA*, *PU.1* et *MYB*. Ainsi, alors que *MYB* pourrait constituer un gène clé dans la leucémogénèse des LPDC, *RUNX1* apparaît impliqué dans celle des LAM-pDC. De plus, parmi les cibles transcriptionnelles de *RUNX1*, on retrouve l'interleukine-3 et le récepteur du *macrophage-colony stimulating factor*, qui font écho à la différenciation myéloïde MDP des pDCs²⁸⁷. Enfin, l'invalidation de *RUNX1* conduirait à une augmentation d'expression des protéines *RUNX2* et *RUNX3*, car le niveau global de la famille *RUNX* est réputé constant et suit un mécanisme compensatoire en cas de baisse de niveau d'une des 3 protéines (Figure 38)^{288,289}. Par conséquent, l'hypothèse que nous émettons est un switch *RUNX1* vers *RUNX2*, ce qui promouvrait l'engagement dans la lignée pDC puisque *RUNX2* est un acteur clé de la différenciation en pDCs^{231,232}.

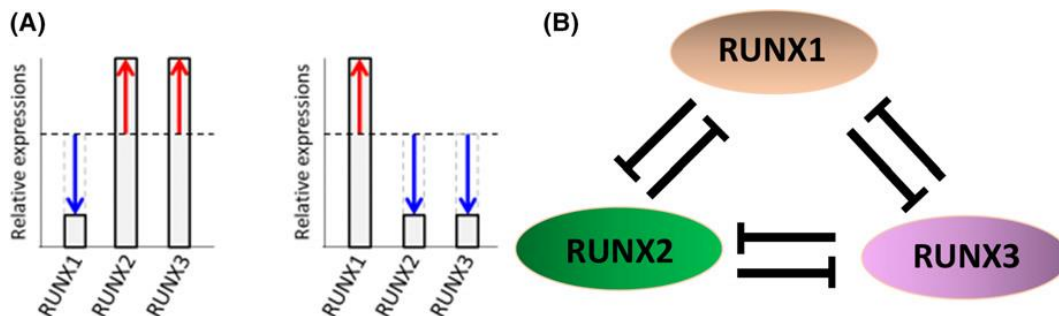


Figure 38 : Mécanisme de compensation génétique du niveau global de la famille RUNX, d'après Kamikubo *et al.*, 2018²⁸⁹
Un niveau diminué d'expression de *RUNX1* induit une surexpression de *RUNX2* et *RUNX3* dans certaines cellules leucémiques, tandis qu'une surexpression de *RUNX1* diminue l'expression de *RUNX2* et *RUNX3* par des mécanisme d'inhibition réciproques.

C. Ontogénie pDCs canoniques ou AS-DCs

Comme dans les LPDC, la question de la nature pDC canonique ou AS-DC de cet excès de DCs est en suspens. Un élément de réponse a été apporté par l'étude de Lucas *et al.* où les pDCs en excès dans les LMMC présentent des profils d'expression génique proches des pDCs canoniques, et non des AS-DCs⁵⁵ (Figure 39). Ces pDCs en excès n'apparaissent ni différents des pDCs de moelles normales, ni différents des pDCs résiduels de LMMC sans excès de pDC.

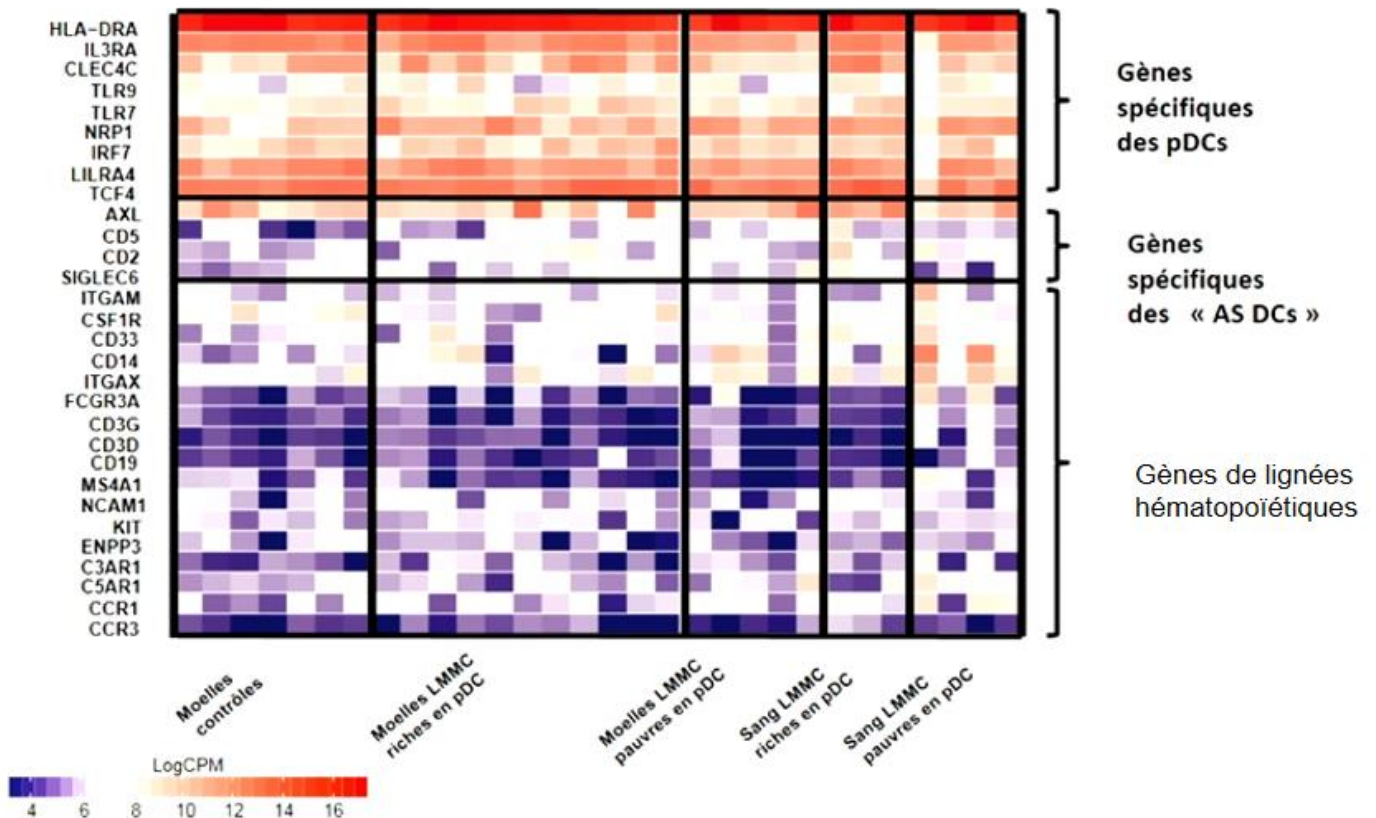


Figure 39 : Les pDCs dans les LMMC-pDC sont des pDCs canoniques et pas des AS-DCs, d'après Lucas *et al.*, 38^{ème} Congrès de la Société Française d'Hématologie, 2018

D. Impact clinique et pronostique

Notre étude de 15 cas de LAM-pDC présente un biais de recrutement, lié à la porte d'entrée que représente l'exclusion diagnostique d'une LPDC. Par conséquent, il est impossible de déterminer la fréquence de ces LAM-pDC et des LAM0-pDC avec mutations *RUNX1* au sein des LAM. Dans l'étude de Xiao *et al.*, partant d'une cohorte conséquente de LAM, cette fréquence a pu être estimée à 5% des LAM (42/850), avec un excès de pDCs supérieur à 2%, allant jusqu'à 35,9%. Egalement, cette étude impute un pronostic défavorable à ces LAM-pDC par rapport autres LAM, en se basant sur la stratification pronostique ELN ($p < 0,0001$), et des médianes de survie potentiellement raccourcies²⁸⁰. Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure de confirmer ou infirmer ces données, compte tenu des faibles effectifs que nous avons pu inclure, et de l'âge avancé des patients, ayant conduit à une prise en charge uniquement palliative pour une partie d'entre eux.

E. Dérégulation immunitaire

Comme dans la LPDC, les pDCs étant des cellules immunitaires régulatrices des lymphocytes T, elles peuvent avoir une fonction régulatrice du micro-environnement tumoral dans les LAM-pDC. Des données ont été obtenues dans les LMMC-pDC et dans les LMC-pDC afin d'étayer cette hypothèse^{55,174}.

Dans la LMC, un excès de pDCs serait associé à l'accumulation de lymphocytes T régulateurs, induisant une réponse anti-tumorale compromise, et un risque accru d'évolution en LA⁵⁵. Les pDCs joueraient un rôle régulateur de l'activité anti-tumorale, avec un impact sur la réponse au traitement. La taille du contingent pDC serait déterminante. En cas d'un nombre limité de pDCs inflammatoires, elles stimuleraient l'immunité anti-leucémique au cours des phases précoces de LMC et sous traitement avec réponse moléculaire profonde. En cas d'excès de pDCs, celles-ci entretiendraient une inflammation chronique, qui stimulerait la persistance des cellules souches leucémiques et encouragerait l'épuisement des lymphocytes T et l'immunosuppression (Figure 40)¹⁷⁴.

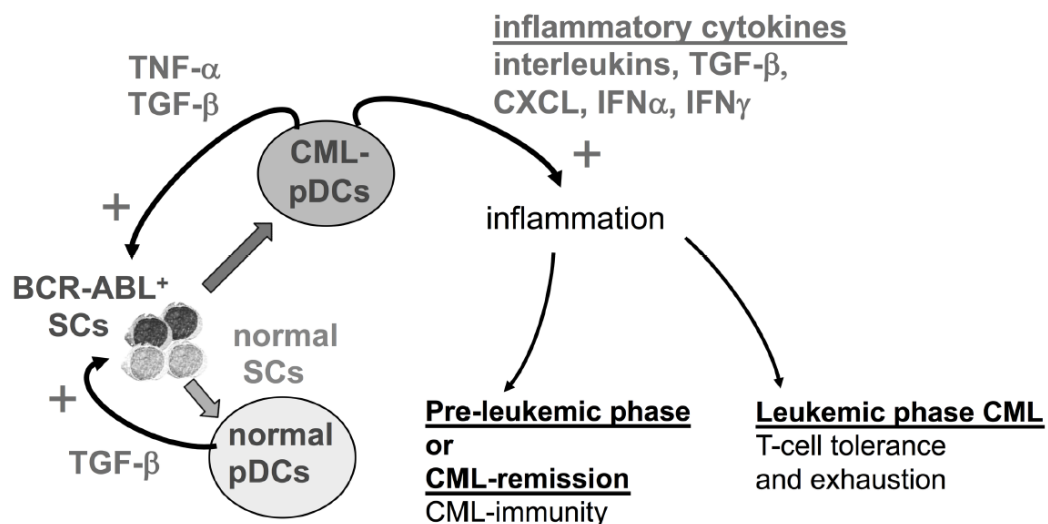


Figure 40 : Rôle présumé des pDCs dans la LMC d'après Inselmann *et al.*, 2018¹⁷⁴

Les cellules souches leucémiques BCR-ABL⁺ (BCR-ABL⁺ SCs) conservent la capacité de se différencier en pDCs tumorales. Ces pDCs (CML-pDCs), comme les pDCs normales sécrètent du TGF-β et du TNF-α, protecteurs pour les cellules leucémiques, favorisant leur persistance. Elles sécrètent aussi des cytokines pro-inflammatoires capables de promouvoir une immunité anti-leucémique (CML-immunity) lors des phases précoces pré-leucémiques de LMC, ou en rémission sous traitement. A l'inverse, ces mêmes cytokines vont promouvoir l'échappement immunitaire en phase leucémique par épuisement et tolérance des LT.

F. Nouvelles approches thérapeutiques

L'expression du CD123 à la fois sur les myéloblastes et les pDCs ouvre la possibilité d'utiliser des thérapies ciblant le CD123, et notamment le tagraxofusp^{118,290}, IMGN632²⁶⁵ ou les CAR-T cells CD123²⁹¹. Xiao *et al.*, sont parvenus à amplifier les blastes tumoraux issus de patient par xénogreffe dans des modèles murins de souris NSG irradiées (PDX pour *Patient Derived Xenograft*). Après transfert à une 2^{ème} souris irradiée, les essais avec tagraxofusp ont montré une élimination des pDCs, mais pas des blastes CD34⁺, malgré une baisse de la masse tumorale totale. Ainsi, l'usage isolé d'une thérapie ciblant le CD123 n'apparaît pas suffisant pour éradiquer les cellules leucémiques.

D'autre part, les anomalies de *RUNX1* pourraient également constituer une piste thérapeutique, comme démontré dans les LAM mutées pour *RUNX1*, notamment avec les inhibiteurs de BET²⁹².

G. Perspectives

Compte tenu de l'ensemble de ces données, plusieurs voies vont être explorées par notre équipe. D'une part, il s'agit de déterminer si toutes les LAM-0 *RUNX1*-mutées présentent un excès de pDCs, et si au sein des LAM-0, seules celles avec excès de pDCs sont *RUNX1*-mutées. Afin de répondre à ces problématiques, nous nous sommes rapprochés du groupe collaboratif ALFA (*Acute Leukemia French Association*), afin d'analyser des cohortes conséquentes de LAM protocolaires (ALFA-0701, ALFA-0702 et ALFA-1200) afin de comparer les LAM-0 *RUNX1* mutées et les LAM-0 *RUNX1* non mutées, notamment leur profil phénotypique, à la recherche d'un excès de pDCs, et leur profil moléculaire. L'objectif est de disposer d'un effectif d'une cinquantaine de LAM-0 et d'une cinquantaine de LAM *RUNX1* mutées, puis de recouper ces deux entités, avec une évaluation de l'impact pronostic dans ces cohortes (Figure 41).

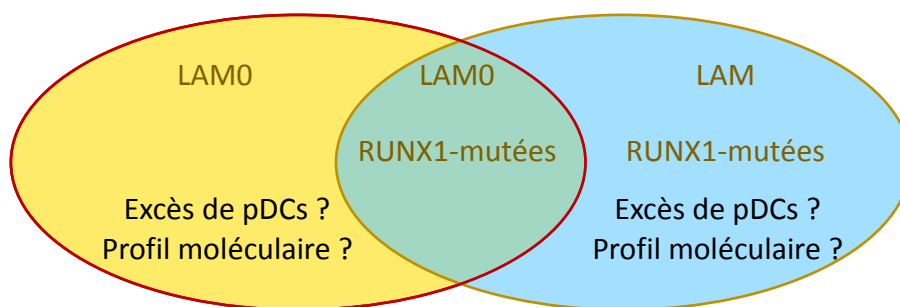


Figure 41 : Etude conjointe des LAM0 et des LAM mutées pour *RUNX1* à la recherche de LAM-pDC

D'autre part, les thématiques de l'équipe concernant le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans les LPDC nous amènent naturellement à adapter ces concepts aux LAM-pDC, notamment par combinaison de chimiothérapies, de thérapies ciblées et de CAR-T cells. Pour cela, nous envisageons des études *in vitro* après obtention de lignées cellulaires dérivées de ces LAM-pDC et *in vivo* sur modèle murins NSG et NSGS, avec amplification de cellules de patients par xénogreffe (PDX). Ces travaux sont en cours

Conclusion

Au final, la contrepartie physiologique des blastes de LPDC n'est pas certaine entre les pDCs canoniques et les AS-DCs. Les LPDC se caractérisent par une hétérogénéité phénotypique, génétique et transcriptomique qui entraîne des difficultés diagnostiques, illustrées ici par une LAL-T reclassée *a posteriori* en LPDC. Les LPDC dérégulent le cycle cellulaire et la voie NF- κ B, mais également certains facteurs de transcriptions clés tels que *SOX4*, *ETV6* et *IKZF1*, ainsi que les voies de l'IFN. Divers marqueurs évoquent une origine AS-DC mais certaines anomalies génétiques acquises par la cellule tumorale pourraient mimer un profil AS-DC. En particulier, les capacités réduites de sécrétion en IFN-I des AS-DCs sont retrouvées dans certains cas de LPDC, mais elles peuvent s'expliquer par une délétion 9p impliquant les gènes de l'IFN-I, ce qui entraîne une expression génique diminuée. De plus, le profil AS-DC n'est pas retrouvé dans l'intégralité des LPDC, mais uniquement dans certains cas. L'hypothèse de plusieurs types de LPDC, d'origines cellulaires différentes reste ouverte, même si les sous-types envisagés pourraient être liés à des réarrangements géniques différents, de *MYB* et *MYC* par exemple, et pas à l'ontogénie. Ces hypothèses doivent être explorées sur une cohorte plus conséquente, et nous visons actuellement un tel objectif par RNA-seq (projet FreGATE-pDC). Cette étude permettra également d'étudier le microenvironnement tumoral des LPDC, qui est encore méconnu, bien que la cellule tumorale soit dérivée d'une CPA régulatrice de la réponse lymphocytaire T. Ces dernières années, de nombreuses équipes de renommée internationale ont concentré leurs efforts sur une meilleure caractérisation des LPDC, avec une dynamique de publications croissante, illustrant l'intérêt porté par la communauté scientifique pour ces hémopathies. En particulier, l'usage de nouvelles approches thérapeutiques a été évoqué, des hypométhylants tels que la 5-azacytidine au vénétoclax, aux bortézomib et carfilzomib en passant par les différentes stratégies de ciblage du CD123. Pour l'heure, ces pistes thérapeutiques ne sont pas optimisées à travers des combinaisons et ne tiennent pas compte de l'hétérogénéité des anomalies génétiques possibles dans cette leucémie. Nos travaux permettront vraisemblablement de clarifier ces points, cruciaux.

Concernant les LAM-pDC, notre travail a permis de préciser leur présentation biologique, à savoir un excès de blastes myéloïdes n'exprimant pas de marqueurs pDC, associé à un excès de pDCs plus ou moins important présentant un phénotype CD4⁺ CD56⁻ systématique et un profil différent de celui des LPDC. L'expression du CD34 dans certains cas, les images phénotypiques de maturation à partir de blastes immatures et la communauté du profil mutationnel arguent pour une origine commune aux blastes, aux pDCs ainsi qu'aux monocytes et cDCs retrouvés dans ces MO. Toutes ces cellules seraient issues d'un progéniteur commun à différenciation monocytaires et dendritiques, telle que le MDP. La présence de mutations de *RUNX1* dans tous les cas de LAM0-pDC suggère qu'une entité de LAM0-pDC *RUNX1*-mutées pourrait être isolée, dont le pronostic reste à définir. Plus généralement, l'impact clinique de cet excès de pDC reste à préciser, ainsi que les dérégulations immunitaires qui pourraient découler d'un excès de CPA telles que les pDCs.

Bibliographie

1. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116(16):e74-80.
2. Katsura Y. Redefinition of lymphoid progenitors. *Nat Rev Immunol* 2002;2(2):127–132.
3. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003;21:759–806.
4. Faustman DL, Steinman RM, Gebel HM, Hauptfeld V, Davie JM, Lacy PE. Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(12):3864–3868.
5. Knight SC, Hunt R, Dore C, Medawar PB. Influence of dendritic cells on tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(13):4495–4497.
6. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137(5):1142–1162.
7. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol Baltim Md 1950* 2000;165(11):6037–6046.
8. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunol*;31.
9. Chicha L, Jarrossay D, Manz MG. Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J Exp Med* 2004;200(11):1519–1524.
10. Ishikawa F, Niino H, Iino T, et al. The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* 2007;110(10):3591–3660.
11. Lee J, Breton G, Oliveira TYK, et al. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J Exp Med* 2015;212(3):385–399.
12. Lennert K, Remmele W. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes]. *Acta Haematol* 1958;19(2):99–113.
13. Feller AC, Lennert K, Stein H, Bruhn HD, Wuthe HH. Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases. *Histopathology* 1983;7(6):825–839.
14. Facchetti F, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Pulford K, van den Oord JJ, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* 1988;133(1):15–21.
15. Davidson S, Crotta S, McCabe TM, Wack A. Pathogenic potential of interferon $\alpha\beta$ in acute influenza infection. *Nat Commun* 2014;5:3864.
16. O'Brien M, Manches O, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv Exp Med Biol* 2013;762:71–107.
17. Perussia B, Fanning V, Trinchieri G. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1985;4(3):120–137.

18. Fitzgerald-Bocarsly P, Feldman M, Mendelsohn M, Curl S, Lopez C. Human mononuclear cells which produce interferon-alpha during NK(HSV-FS) assays are HLA-DR positive cells distinct from cytolytic natural killer effectors. *J Leukoc Biol* 1988;43(4):323–334.
19. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185(6):1101–1111.
20. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284(5421):1835–1837.
21. Rönnblom L, Ramstedt U, Alm GV. Properties of human natural interferon-producing cells stimulated by tumor cell lines. *Eur J Immunol* 1983;13(6):471–476.
22. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15(8):471–485.
23. Gschwandtner M, Mommert S, Köther B, Werfel T, Gutzmer R. The histamine H4 receptor is highly expressed on plasmacytoid dendritic cells in psoriasis and histamine regulates their cytokine production and migration. *J Invest Dermatol* 2011;131(8):1668–1676.
24. Mazzoni A, Leifer CA, Mullen GED, Kennedy MN, Klinman DM, Segal DM. Cutting edge: histamine inhibits IFN-alpha release from plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2003;170(5):2269–2273.
25. Smith N, Vidalain P-O, Nisole S, Herbeuval J-P. An efficient method for gene silencing in human primary plasmacytoid dendritic cells: silencing of the TLR7/IRF-7 pathway as a proof of concept. *Sci Rep* 2016;629891.
26. Sharma MD, Baban B, Chandler P, et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007;117(9):2570–2582.
27. Gottenberg J-E, Cagnard N, Lucchesi C, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2770–2775.
28. van der Pouw Kraan TCTM, Wijbrandts CA, van Baarsen LGM, et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 2007;66(8):1008–1014.
29. Rönnblom L, Pascual V. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus* 2008;17(5):394–399.
30. Vermi W, Lonardi S, Morassi M, et al. Cutaneous distribution of plasmacytoid dendritic cells in lupus erythematosus. Selective tropism at the site of epithelial apoptotic damage. *Immunobiology* 2009;214(9–10):877–886.
31. van Bon L, Affandi AJ, Broen J, et al. Proteome-wide Analysis and CXCL4 as a Biomarker in Systemic Sclerosis. *N Engl J Med* 2014;370(5):433–443.
32. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *J Exp Med* 2005;202(1):135–143.
33. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2610–2615.

34. Ah Kioon MD, Tripodo C, Fernandez D, et al. Plasmacytoid dendritic cells promote systemic sclerosis with a key role for TLR8. *Sci Transl Med*;10(423):.
35. Bossard C, Malard F, Arbez J, et al. Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 2012;26(7):1471–1474.
36. Malard F, Bossard C, Brissot E, et al. Increased plasmacytoid dendritic cells and ROR γ t-expressing immune effectors in cutaneous acute graft-versus-host disease. *J Leukoc Biol* 2013;94(6):1337–1343.
37. Li S, Wu J, Zhu S, Liu Y-J, Chen J. Disease-Associated Plasmacytoid Dendritic Cells. *Front Immunol* 2017;8:1268.
38. Lombardi VC, Khaiboullina SF, Rizvanov AA. Plasmacytoid dendritic cells, a role in neoplastic prevention and progression. *Eur J Clin Invest* 2015;45 Suppl 11–8.
39. Tsukamoto N, Okada S, Onami Y, Sasaki Y, Umezawa K, Kawakami Y. Impairment of plasmacytoid dendritic cells for IFN production by the ligand for immunoglobulin-like transcript 7 expressed on human cancer cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2009;15(18):5733–5743.
40. Chauhan D, Singh AV, Brahmandam M, et al. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell* 2009;16(4):309–323.
41. Ray A, Das DS, Song Y, et al. A novel agent SL-401 induces anti-myeloma activity by targeting plasmacytoid dendritic cells, osteoclastogenesis and cancer stem-like cells. *Leukemia* 2017;31(12):2652–2660.
42. Garnache-Ottou F, Chaperot L, Biichle S, et al. Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2005;105(3):1256–1264.
43. Röck J, Schneider E, Grün JR, et al. CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCgamma2. *Eur J Immunol* 2007;37(12):3564–3575.
44. Cao W, Rosen DB, Ito T, et al. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med* 2006;203(6):1399–1405.
45. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 2018;154(1):3–20.
46. Martín-Martín L, Almeida J, Hernández-Campo PM, Sánchez ML, Lécrevisse Q, Orfao A. Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion (Paris)* 2009;49(8):1692–1708.
47. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol Baltim Md 1950* 2009;182(11):6815–6823.
48. Bryant C, Fromm PD, Kupresanin F, et al. A CD2 high-expressing stress-resistant human plasmacytoid dendritic-cell subset. *Immunol Cell Biol* 2016;94(5):447–457.
49. Zhang H, Gregorio JD, Iwahori T, et al. A distinct subset of plasmacytoid dendritic cells induces activation and differentiation of B and T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114(8):1988–1993.

50. Comeau MR, Van der Vuurst de Vries A-R, Maliszewski CR, Galibert L. CD123bright plasmacytoid predendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion? *J Immunol Baltim Md* 1950 2002;169(1):75–83.
51. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002;100(13):4512–4520.
52. Wang W, Khoury JD, Miranda RN, et al. Immunophenotypic characterization of reactive and neoplastic plasmacytoid dendritic cells permits establishment of a 10-color flow cytometric panel for initial workup and residual disease evaluation of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Haematologica* [Epub ahead of print].
53. 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.
54. Yu H, Zhang P, Yin X, et al. Human BDCA2+CD123+CD56+ dendritic cells (DCs) related to blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm represent a unique myeloid DC subset. *Protein Cell* 2015;6(4):297–306.
55. Lucas N, Duchmann M, Rameau P, et al. Biology and prognostic impact of clonal plasmacytoid dendritic cells in chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2019;33(10):2466–2480.
56. Xiao W, Goldberg AD, Famulare CA, et al. Loss of plasmacytoid dendritic cell differentiation is highly predictive for post-induction measurable residual disease and inferior outcomes in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2019;104(7):1378–1387.
57. Umemoto E, Otani K, Ikeno T, et al. Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling. *J Immunol Baltim Md* 1950 2012;189(1):191–199.
58. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*;356(6335):.
59. Maraskovsky E, Daro E, Roux E, et al. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 2000;96(3):878–884.
60. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* 2019;50(1):37–50.
61. Ghosh HS, Cisse B, Bunin A, Lewis KL, Reizis B. Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 2010;33(6):905–916.
62. Cisse B, Caton ML, Lehner M, et al. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 2008;135(1):37–48.
63. Alcántara-Hernández M, Leylek R, Wagar LE, et al. High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity* 2017;47(6):1037–1050.e6.
64. Nagasawa M, Schmidlin H, Hazekamp MG, Schotte R, Blom B. Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B. *Eur J Immunol* 2008;38(9):2389–2400.
65. Reizis B. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Curr Opin Immunol* 2010;22(2):206–211.

66. Allman D, Dalod M, Asselin-Paturel C, et al. Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* 2006;108(13):4025–4034.
67. Schotte R, Rissoan M-C, Bendriss-Vermare N, et al. The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development. *Blood* 2003;101(3):1015–1023.
68. Tsujimura H, Tamura T, Gongora C, et al. ICSBP/IRF-8 retrovirus transduction rescues dendritic cell development in vitro. *Blood* 2003;101(3):961–969.
69. Hambleton S, Salem S, Bustamante J, et al. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N Engl J Med* 2011;365(2):127–138.
70. Zuniga EI, McGavern DB, Pruneda-Paz JL, Teng C, Oldstone MBA. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat Immunol* 2004;5(12):1227–1234.
71. Naik SH, Sathe P, Park H-Y, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 2007;8(11):1217–1226.
72. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 2007;8(11):1207–1216.
73. Dekker JD, Rhee C, Hu Z, et al. Lymphoid origin of a lineage of intrinsically activated plasmacytoid dendritic cell in mice and humans. *bioRxiv* 2018;310680.
74. Dress RJ, Dutertre C-A, Giladi A, et al. Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D+ lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage. *Nat Immunol* 2019;20(7):852–864.
75. Rodrigues PF, Alberti-Servera L, Eremin A, Grajales-Reyes GE, Ivanek R, Tussiwand R. Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 2018;19(7):711–722.
76. Shigematsu H, Reizis B, Iwasaki H, et al. Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 2004;21(1):43–53.
77. Sathe P, Vremec D, Wu L, Corcoran L, Shortman K. Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2013;121(1):11–19.
78. Herman JS, Sagar null, Grün D. FateID infers cell fate bias in multipotent progenitors from single-cell RNA-seq data. *Nat Methods* 2018;15(5):379–386.
79. Gronke K, Kofoed-Nielsen M, Diefenbach A. Innate lymphoid cells, precursors and plasticity. *Immunol Lett* 2016;1799–18.
80. Martín-Gayo E, González-García S, García-León MJ, et al. Spatially restricted JAG1-Notch signaling in human thymus provides suitable DC developmental niches. *J Exp Med* 2017;214(11):3361–3379.
81. Lavaert M, Liang KL, Vandamme N, et al. Integrated scRNA-Seq Identifies Human Postnatal Thymus Seeding Progenitors and Regulatory Dynamics of Differentiating Immature Thymocytes. *Immunity* 2020;52(6):1088-1104.e6.
82. See P, Dutertre C-A, Chen J, et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science*;356(6342):.

83. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2017.
84. Monnereau A, Remontet L, Maynadie M, et al. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2013. 88 p.
85. Bagot M, Bouloc A, Charue D, Wechsler J, Bensussan A, Boumsell L. Do primary cutaneous non-T non-B CD4+CD56+ lymphomas belong to the myelo-monocytic lineage? *J Invest Dermatol* 1998;111(6):1242–1244.
86. DiGiuseppe JA, Louie DC, Williams JE, et al. Blastic natural killer cell leukemia/lymphoma: a clinicopathologic study. *Am J Surg Pathol* 1997;21(10):1223–1230.
87. Brody JP, Allen S, Schulman P, et al. Acute agranular CD4-positive natural killer cell leukemia. Comprehensive clinicopathologic studies including virologic and in vitro culture with inducing agents. *Cancer* 1995;75(10):2474–2483.
88. 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.
89. Chaperot L, Bendriss N, Manches O, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2001;97(10):3210–3217.
90. Bendriss-Vermare N, Chaperot L, Peoc'h M, et al. In situ leukemic plasmacytoid dendritic cells pattern of chemokine receptors expression and in vitro migratory response. *Leukemia* 2004;18(9):1491–1498.
91. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–2405.
92. Feuillard J, Jacob M-C, Valensi F, et al. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. *Blood* 2002;99(5):1556–1563.
93. Lúcio P, Parreira A, Orfao A. CD123hi dendritic cell lymphoma: an unusual case of non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med* 1999;131(7):549–550.
94. Bueno C, Almeida J, Lucio P, et al. Incidence and characteristics of CD4(+)/HLA DRhi dendritic cell malignancies. *Haematologica* 2004;89(1):58–69.
95. Guru Murthy GS, Pemmaraju N, Atallah E. Epidemiology and survival of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Leuk Res* 2018;7321–23.
96. Wang S, Wang X, Liu M, Bai O. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: update on therapy especially novel agents. *Ann Hematol* 2018;97(4):563–572.
97. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, et al. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia. *Br J Haematol* 2009;145(5):624–636.
98. Garnache-Ottou F, Vidal C, Biichlé S, et al. How should we diagnose and treat blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients? *Blood Adv* 2019;3(24):4238–4251.
99. Ramachandran V, Park KE, Loya A, Duvic M. Second primary malignancies in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a national database study. *J Am Acad Dermatol* 2020;83(6):1786–1789.

100. Julia F, Dalle S, Duru G, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: clinico-immunohistochemical correlations in a series of 91 patients. *Am J Surg Pathol* 2014;38(5):673–680.
101. Tsagarakis NJ, Kentrou NA, Papadimitriou KA, et al. Acute lymphoplasmacytoid dendritic cell (DC2) leukemia: results from the Hellenic Dendritic Cell Leukemia Study Group. *Leuk Res* 2010;34(4):438–446.
102. Jegalian AG, Buxbaum NP, Facchetti F, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in children: diagnostic features and clinical implications. *Haematologica* 2010;95(11):1873–1879.
103. Suzuki K, Suzuki Y, Hama A, et al. Recurrent MYB rearrangement in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Leukemia* 2017;31(7):1629–1633.
104. Hama A, Kudo K, Itzel BV, et al. Plasmacytoid dendritic cell leukemia in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31(5):339–343.
105. Deng W, Yang M, Kuang F, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in children: A review of two cases. *Mol Clin Oncol* 2017;7(4):709–715.
106. Li Y, Sun V, Sun W, Pawlowska A. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm in Children. *Hematol Oncol Clin North Am* 2020;34(3):601–612.
107. Bilbao EAR, Chirife AM, Florio D, Giménez LB, Marino L, Rosso DA. [Hematodermic CD4+ CD56+ neoplasm in childhood]. *Medicina (Mex)* 2008;68(2):147–150.
108. Sakamoto K, Katayama R, Asaka R, et al. Recurrent 8q24 rearrangement in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: association with immunoblastoid cytomorphology, MYC expression, and drug response. *Leukemia* 2018;32(12):2590–2603.
109. Sapienza MR, Fuligni F, Agostinelli C, et al. Molecular profiling of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm reveals a unique pattern and suggests selective sensitivity to NF-κB pathway inhibition. *Leukemia* 2014;28(8):1606–1616.
110. Sumarriva Lezama L, Chisholm KM, Carneal E, et al. An analysis of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with translocations involving the MYC locus identifies t(6;8)(p21;q24) as a recurrent cytogenetic abnormality. *Histopathology* 2018;73(5):767–776.
111. Deconinck E, Petrella T, Garnache Ottou F. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm: Clinical Presentation and Diagnosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2020;34(3):491–500.
112. Hirner JP, O'Malley JT, LeBoeuf NR. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm: The Dermatologist's Perspective. *Hematol Oncol Clin North Am* 2020;34(3):501–509.
113. Julia F, Petrella T, Beylot-Barry M, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: clinical features in 90 patients. *Br J Dermatol* 2013;169(3):579–586.
114. Tsagarakis NJ, Paterakis G. Dendritic Cell Leukemia: a Review. *Curr Oncol Rep* 2020;22(6):55.
115. Venugopal S, Zhou S, El Jamal SM, Lane AA, Mascarenhas J. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm-Current Insights. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2019;19(9):545–554.
116. Chou P-Y, Lai C-L, Huang P. Complete monocular vision loss due to optic nerve involvement of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Acta Oncol Stockh Swed* 2018;57(7):989–991.

117. 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. *Oncotarget* 2016;7(9):10174–10181.
118. Pemmaraju N, Lane AA, Sweet KL, et al. Tagraxofusp in Blastic Plasmacytoid Dendritic-Cell Neoplasm. *N Engl J Med* 2019;380(17):1628–1637.
119. Lane AA. Novel Therapies for Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. *Hematol Oncol Clin North Am* 2020;34(3):589–600.
120. Assaf C, Gellrich S, Steinhoff M, et al. Cutaneous lymphomas in Germany: an analysis of the Central Cutaneous Lymphoma Registry of the German Society of Dermatology (DDG). *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG* 2007;5(8):662–668.
121. Dalle S, Beylot-Barry M, Bagot M, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: is transplantation the treatment of choice? *Br J Dermatol* 2010;162(1):74–79.
122. Dietrich S, Andrulis M, Hegenbart U, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasia (BPDC) in elderly patients: results of a treatment algorithm employing allogeneic stem cell transplantation with moderately reduced conditioning intensity. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2011;17(8):1250–1254.
123. Hansford JR, Kotecha RS, Jevon G, Cole CH, Gottardo NG. Efficacy of acute myeloid leukemia therapy without stem-cell transplantation in a child with blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Haematologica* 2013;98(3):e30-31.
124. Laribi K, Baugier de Materre A, Sobh M, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: results of an international survey on 398 adult patients. *Blood Adv* 2020;4(19):4838–4848.
125. Pagano L, Valentini CG, Pulsoni A, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with leukemic presentation: an Italian multicenter study. *Haematologica* 2013;98(2):239–246.
126. 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.
127. Reimer P, Rüdiger T, Kraemer D, et al. What is CD4+CD56+ malignancy and how should it be treated? *Bone Marrow Transplant* 2003;32(7):637–646.
128. Roos-Weil D, Dietrich S, Boumendil A, et al. 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.
129. Karrich JJ, Jachimowski LCM, Uittenbogaart CH, Blom B. The plasmacytoid dendritic cell as the Swiss army knife of the immune system: molecular regulation of its multifaceted functions. *J Immunol Baltim Md* 1950 2014;193(12):5772–5778.
130. Saas P, Perruche S. Functions of TGF- β -exposed plasmacytoid dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 2012;32(6):529–553.
131. Suzuki R, Nakamura S, Suzumiya J, et al. Blastic natural killer cell lymphoma/leukemia (CD56-positive blastic tumor): prognostication and categorization according to anatomic sites of involvement. *Cancer* 2005;104(5):1022–1031.
132. Taylor J, Haddadin M, Upadhyay VA, et al. Multicenter Analysis of Outcomes in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm Offers a Pre-Targeted Therapy Benchmark. *Blood* 2019;134(8):678–687.

133. 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.
134. 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.
135. Lucioni M, Novara F, Fiandrino G, et al. Twenty-one cases of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: focus on biallelic locus 9p21.3 deletion. *Blood* 2011;118(17):4591–4594.
136. Emadali A, Hoghoughi N, Duley S, et al. Haploinsufficiency for NR3C1, the gene encoding the glucocorticoid receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms. *Blood* 2016;127(24):3040–3053.
137. Cota C, Vale E, Viana I, et al. Cutaneous manifestations of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm-morphologic and phenotypic variability in a series of 33 patients. *Am J Surg Pathol* 2010;34(1):75–87.
138. Petrella T, Meijer CJLM, Dalac S, et al. TCL1 and CLA expression in agranular CD4/CD56 hematodermic neoplasms (blastic NK-cell lymphomas) and leukemia cutis. *Am J Clin Pathol* 2004;122(2):307–313.
139. Khoury JD. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. *Curr Hematol Malig Rep* 2018;13(6):477–483.
140. 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.
141. Lamar E, Roggy A, Le Calvez G, et al. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm: Report of a Case with Atypical Cytology and Immunophenotype. *J Blood Disord* 2015;2(3):1033.
142. Lee JM, Kim IS, Lee JN, et al. Acute Myeloid Leukemia With MLL Rearrangement and CD4+/CD56+ Expression can be Misdiagnosed as Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm: Two Case Reports. *Ann Lab Med* 2016;36(5):494–497.
143. Marafioti T, Paterson JC, Ballabio E, et al. Novel markers of normal and neoplastic human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2008;111(7):3778–3792.
144. Montes-Moreno S, Ramos-Medina R, Martínez-López A, et al. SPIB, a novel immunohistochemical marker for human blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: characterization of its expression in major hematolymphoid neoplasms. *Blood* 2013;121(4):643–647.
145. Angelot-Delettre F, Biichle S, Ferrand C, et al. Intracytoplasmic detection of TCL1--but not ILT7-by flow cytometry is useful for blastic plasmacytoid dendritic cell leukemia diagnosis. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2012;81(8):718–724.
146. Petrella T, Facchetti F. Tumoral aspects of plasmacytoid dendritic cells: what do we know in 2009? *Autoimmunity* 2010;43(3):210–214.
147. Ceribelli M, Hou ZE, Kelly PN, et al. A Druggable TCF4- and BRD4-Dependent Transcriptional Network Sustains Malignancy in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. *Cancer Cell* 2016;30(5):764–778.
148. Sukswai N, Aung PP, Yin CC, et al. Dual Expression of TCF4 and CD123 is Highly Sensitive and Specific For Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. *Am J Surg Pathol* 2019;43(10):1429–1437.

149. Giagounidis A a. N, Heinsch M, Haase S, Aul C. Early plasmacytoid dendritic cell leukemia/lymphoma coexpressing myeloid antigenes. *Ann Hematol* 2004;83(11):716–721.
150. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Saas P. Plasmacytoid dendritic cell leukaemia/lymphoma: towards a well defined entity? *Br J Haematol* 2007;136(4):539–548.
151. Satou A, Bennani NN, Feldman AL. Update on the classification of T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Expert Rev Hematol* 2019;12(10):833–843.
152. Nava VE, Jaffe ES. The pathology of NK-cell lymphomas and leukemias. *Adv Anat Pathol* 2005;12(1):27–34.
153. Lebecque B, Vial J-P, Pigneux A, Lechevalier N. Chronic myelomonocytic leukaemia followed by blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Br J Haematol* 2019;185(3):398.
154. Hu Z, Sun T. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm associated with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2016;128(12):1664–1664.
155. Espasa A, Sorigue M, Tapia G, et al. Chronic myelomonocytic leukemia and blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. A case report and systematic review. *Cytometry B Clin Cytom* [Epub ahead of print].
156. Krause JR, Baugh L, Swink A, Burch M. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm following acquired erythropoietic protoporphyria. *Proc Bayl Univ Med Cent* 2017;30(4):450–451.
157. Chamoun K, Loghavi S, Pemmaraju N, et al. Early detection of transformation to BPDCN in a patient with MDS. *Exp Hematol Oncol* 2018;726.
158. Yun S, Sokol L, Zhang L. Disseminated Cutaneous Lesions in a Patient With a Medical History of Myelodysplastic Syndrome. *JAMA Oncol* 2018;4(9):1281–1282.
159. Kazakov DV, Mentzel T, Burg G, Dummer R, Kempf W. Blastic natural killer-cell lymphoma of the skin associated with myelodysplastic syndrome or myelogenous leukaemia: a coincidence or more? *Br J Dermatol* 2003;149(4):869–876.
160. Patnaik MM, Lasho T, Howard M, et al. Biallelic inactivation of the retinoblastoma gene results in transformation of chronic myelomonocytic leukemia to a blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: shared clonal origins of two aggressive neoplasms. *Blood Cancer J* 2018;8(9):82.
161. B Brunetti L, Di Battista V, Venanzi A, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm and chronic myelomonocytic leukemia: a shared clonal origin. *Leukemia*. 2017;31(5):1238-1240. doi:10.1038/leu.2017.38
162. Milley S, Thomas L, Balme B, Dalle S. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm following Waldenström macroglobulinemia. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV* 2016;30(5):904–905.
163. Khan AM, Munir A, Raval M, Mehdi S. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm in the background of myeloproliferative disorder and chronic lymphocytic leukaemia. *BMJ Case Rep*;12(7):.
164. Harvell JD, Fulton R, Jones CD, Terris DJ, Warnke RA. Composite dendritic cell neoplasm (NOS) and small lymphocytic lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM* 2000;8(4):322–328.
165. Facchetti F, Cigognetti M, Fisogni S, Rossi G, Lonardi S, Vermi W. Neoplasms derived from plasmacytoid dendritic cells. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2016;29(2):98–111.

166. Vermi W, Facchetti F, Rosati S, et al. Nodal and extranodal tumor-forming accumulation of plasmacytoid monocytes/interferon-producing cells associated with myeloid disorders. *Am J Surg Pathol* 2004;28(5):585–595.
167. Vitte F, Fabiani B, Bénet C, et al. Specific skin lesions in chronic myelomonocytic leukemia: a spectrum of myelomonocytic and dendritic cell proliferations: a study of 42 cases. *Am J Surg Pathol* 2012;36(9):1302–1316.
168. Chen Y-C, Chou J-M, Ketterling RP, Letendre L, Li C-Y. Histologic and immunohistochemical study of bone marrow monocytic nodules in 21 cases with myelodysplasia. *Am J Clin Pathol* 2003;120(6):874–881.
169. Huang Y, Wang Y, Chang Y, et al. Myeloid Neoplasms with Elevated Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation Reflect the Maturation Process of Dendritic Cells. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2020;97(1):61–69.
170. Hamadeh F, Awadallah A, Meyerson HJ, Beck RC. Flow Cytometry Identifies a Spectrum of Maturation in Myeloid Neoplasms Having Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation. *Cytometry B Clin Cytom* 2020;98(1):43–51.
171. Bodmer A, Menter T, Juskevicius D, et al. Sharing of a PTPN11 mutation by myelodysplastic bone marrow and a mature plasmacytoid dendritic cell proliferation provides evidence for their common myelomonocytic origin. *Virchows Arch Int J Pathol* 2017;470(4):469–473.
172. Khoury JD, Medeiros LJ, Manning JT, Sulak LE, Bueso-Ramos C, Jones D. CD56(+) TdT(+) blastic natural killer cell tumor of the skin: a primitive systemic malignancy related to myelomonocytic leukemia. *Cancer* 2002;94(9):2401–2408.
173. Orazi A, Chiu R, O'Malley DP, et al. Chronic myelomonocytic leukemia: The role of bone marrow biopsy immunohistology. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2006;19(12):1536–1545.
174. Inselmann S, Wang Y, Saussele S, et al. Development, Function, and Clinical Significance of Plasmacytoid Dendritic Cells in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Res* 2018;78(21):6223–6234.
175. Bénet C, Gomez A, Aguilar C, et al. Histologic and immunohistologic characterization of skin localization of myeloid disorders: a study of 173 cases. *Am J Clin Pathol* 2011;135(2):278–290.
176. Dargent J-L, Delannoy A, Pieron P, Husson B, Debecker C, Petrella T. Cutaneous accumulation of plasmacytoid dendritic cells associated with acute myeloid leukemia: a rare condition distinct from blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *J Cutan Pathol* 2011;38(11):893–898.
177. Wang M, Chen Y-J, Wang L-R, Wang Y-Z, Lu J. Plasmacytoid Dendritic Cells Proliferation Coexisted with Acute Myeloid Leukemia. *Chin Med J (Engl)* 2018;131(15):1866–1867.
178. Wang P, Feng Y, Deng X, et al. Tumor-forming plasmacytoid dendritic cells in acute myelocytic leukemia: a report of three cases and literature review. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10(7):7285–7291.
179. Dalland JC, Meyer R, Ketterling RP, Reichard KK. Myeloid Sarcoma With CBFB-MYH11 Fusion (inv(16) or t(16;16)) Prevails in the Abdomen. *Am J Clin Pathol* 2020;153(3):333–341.
180. Fracchiolla NS, Iurlo A, Ferla V, et al. Concomitant Occurrence of Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm and Acute Myeloid Leukaemia after Lenalidomide Treatment for. *Clin Lab* 2017;63(9):1513–1517.

181. Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, et al. Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood* 2001;98(13):3750–3756.
182. Rickmann M, Krauter J, Stamer K, et al. Elevated frequencies of leukemic myeloid and plasmacytoid dendritic cells in acute myeloid leukemia with the FLT3 internal tandem duplication. *Ann Hematol* 2011;90(9):1047–1058.
183. Szczepaniak A, Machnicki M, Gniot M, et al. Germline missense NF1 mutation in an elderly patient with a blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Int J Hematol* 2019;110(1):102–106.
184. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:179–198.
185. Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia* 2018;32(3):675–684.
186. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2010;28(29):4473–4479.
187. Flynt E, Bisht K, Sridharan V, Ortiz M, Towfic F, Thakurta A. Prognosis, Biology, and Targeting of TP53 Dysregulation in Multiple Myeloma. *Cells*;9(2):.
188. Yu J, Li Y, Zhang D, Wan D, Jiang Z. Clinical implications of recurrent gene mutations in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol* 2020;94.
189. Yang RK, Qing Y, Jelloul FZ, et al. Identification of biomarkers of immune checkpoint blockade efficacy in recurrent or refractory solid tumor malignancies. *Oncotarget* 2020;11(6):600–618.
190. Döhner K, Paschka P, Döhner H. [Acute myeloid leukemia]. *Internist* 2015;56(4):354–363.
191. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 2015;126(1):9–16.
192. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* 2012;12(9):599–612.
193. Inoue D, Kitaura J, Togami K, et al. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation–altering ASXL1 mutations. *J Clin Invest* 2013;123(11):4627–4640.
194. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009;361(11):1058–1066.
195. Patnaik MM, Lasho TL, Vijayvargiya P, et al. Prognostic interaction between ASXL1 and TET2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J* 2016;6e385.
196. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* 2013;121(12):2186–2198.
197. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121(18):3563–3572.
198. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010;24(6):1128–1138.

199. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia* 2014;28(9):1774–1783.
200. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med* 2014;371(26):2488–2498.
201. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129(4):424–447.
202. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
203. Ceroi A, Masson D, Roggy A, et al. LXR agonist treatment of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm restores cholesterol efflux and triggers apoptosis. *Blood* 2016;128(23):2694–2707.
204. Dijkman R, van Doorn R, Szuhai 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.
205. Sapienza MR, Abate F, Melle F, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: genomics mark epigenetic dysregulation as a primary therapeutic target. *Haematologica* 2019;104(4):729–737.
206. 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.
207. Kurt H, Khoury JD, Medeiros LJ, Huh YO. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with unusual morphology, MYC rearrangement and TET2 and DNMT3A mutations. *Br J Haematol* 2018;181(3):305.
208. Ladikou E, Ottolini B, Nawaz N, et al. Clonal evolution in the transition from cutaneous disease to acute leukemia suggested by liquid biopsy in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Haematologica* 2018;103(5):e196–e199.
209. Stenzinger A, Endris V, Pfarr N, et al. Targeted ultra-deep sequencing reveals recurrent and mutually exclusive mutations of cancer genes in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Oncotarget* 2014;5(15):6404–6413.
210. Suma S, Sakata-Yanagimoto M, Nguyen TB, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm arising from clonal hematopoiesis. *Int J Hematol* 2018;108(4):447–451.
211. Toya T, Nishimoto N, Koya J, et al. The first case of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with MLL-ENL rearrangement. *Leuk Res* 2012;36(1):117–118.
212. Yang N, Huh J, Chung WS, Cho M-S, Ryu K-H, Chung H-S. KMT2A (MLL)-MLLT1 rearrangement in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Cancer Genet* 2015;208(9):464–467.
213. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 2003;102(7):2395–2402.
214. Togami K, Madan V, Li J, et al. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm (BPDCN) Harbors Frequent Spliceosome Mutations That Cause Aberrant RNA Splicing Affecting Genes Critical in pDC Differentiation and Function. *Blood* 2016;128(22):738–738.

215. Graubert TA, Shen D, Ding L, et al. RECURRENT MUTATIONS IN THE U2AF1 SPLICING FACTOR IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES. *Nat Genet* 2011;44(1):53–57.
216. Ilagan JO, Ramakrishnan A, Hayes B, et al. U2AF1 mutations alter splice site recognition in hematological malignancies. *Genome Res* 2015;25(1):14–26.
217. Pellagatti A, Boulton J. Splicing factor mutant myelodysplastic syndromes: Recent advances. *Adv Biol Regul* 2020;75100655.
218. 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+ haematodermic neoplasms and contribute to the aggressiveness of the disease. *Leukemia* 2009;23(4):698–707.
219. Tang Z, Tang G, Wang SA, et al. Simultaneous deletion of 3'ETV6 and 5'EWSR1 genes in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: case report and literature review. *Mol Cytogenet* 2016;923.
220. Wiesner T, Obenauf AC, Cota C, Fried I, Speicher MR, Cerroni L. Alterations of the cell-cycle inhibitors p27(KIP1) and p16(INK4a) are frequent in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms. *J Invest Dermatol* 2010;130(4):1152–1157.
221. Montañó A, Ordoñez JL, Alonso-Pérez V, et al. ETV6/RUNX1 Fusion Gene Abrogation Decreases the Oncogenicity of Tumour Cells in a Preclinical Model of Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Cells*;9(1):.
222. Qinrong W, Shasha D, Hong Y, et al. ETV6 mutation in a cohort of 970 patients with hematologic malignancies. *Haematologica*, October 2014.
223. Chen Q, Shi Y, Chen Y, Ji T, Li Y, Yu L. Multiple functions of Ikaros in hematological malignancies, solid tumor and autoimmune diseases. *Gene* 2019;68447–52.
224. Dhanyamraju PK, Iyer S, Smink G, et al. Transcriptional Regulation of Genes by Ikaros Tumor Suppressor in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*;21(4):.
225. Tzankov A, Hebeda K, Kremer M, et al. Plasmacytoid dendritic cell proliferations and neoplasms involving the bone marrow : Summary of the workshop cases submitted to the 18th Meeting of the European Association for Haematopathology (EAHP) organized by the European Bone Marrow Working Group, Basel 2016. *Ann Hematol* 2017;96(5):765–777.
226. Soen B, Vandamme N, Berx G, Schwaller J, Van Vlierberghe P, Goossens S. ZEB Proteins in Leukemia: Friends, Foes, or Friendly Foes? *HemaSphere* 2018;2(3):e43.
227. Boddu PC, Wang SA, Pemmaraju N, et al. 8q24/MYC rearrangement is a recurrent cytogenetic abnormality in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms. *Leuk Res* 2018;6673–78.
228. Chang K-C, Yu-Yun Lee J, Sakamoto K, Baba S, Takeuchi K. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with immunoblastoid morphology and MYC rearrangement and overexpression. *Pathology (Phila)* 2019;51(1):100–102.
229. Bastidas Torres AN, Cats D, Mei H, et al. Whole-genome analysis uncovers recurrent IKZF1 inactivation and aberrant cell adhesion in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Genes Chromosomes Cancer* 2020;59(5):295–308.
230. Zachariadis V, Schoumans J, Barbany G, et al. Homozygous deletions of CDKN2A are present in all dic(9;20)(p13.2;q11.2)-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias and may be important for leukaemic transformation. *Br J Haematol* 2012;159(4):488–491.

231. Kubota S, Tokunaga K, Umezu T, et al. Lineage-specific RUNX2 super-enhancer activates MYC and promotes the development of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Nat Commun* 2019;10(1):1653.
232. Chopin M, Preston SP, Lun ATL, et al. RUNX2 Mediates Plasmacytoid Dendritic Cell Egress from the Bone Marrow and Controls Viral Immunity. *Cell Rep* 2016;15(4):866–878.
233. Quelen C, Lippert E, Struski S, et al. Identification of a transforming MYB-GATA1 fusion gene in acute basophilic leukemia: a new entity in male infants. *Blood* 2011;117(21):5719–5722.
234. Clappier E, Cuccuini W, Kalota A, et al. The C-MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. *Blood* 2007;110(4):1251–1261.
235. Persson M, Andrén Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(44):18740–18744.
236. Brayer KJ, Frerich CA, Kang H, Ness SA. Recurrent Fusions in MYB and MYBL1 Define a Common, Transcription Factor-Driven Oncogenic Pathway in Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma. *Cancer Discov* 2016;6(2):176–187.
237. Zhang J, Wu G, Miller CP, et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet* 2013;45(6):602–612.
238. Gumy-Pause F, Wacker P, Sappino A-P. ATM gene and lymphoid malignancies. *Leukemia* 2004;18(2):238–242.
239. Dyson NJ. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev* 2016;30(13):1492–1502.
240. Mullighan CG. The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2014;2014(1):174–180.
241. Jardin F, Jais J-P, Molina T-J, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood* 2010;116(7):1092–1104.
242. Tang Z, Li Y, Wang W, et al. Genomic aberrations involving 12p/ETV6 are highly prevalent in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms and might represent early clonal events. *Leuk Res* 2018;7386–94.
243. Pileri SA, Ascani S, Cox MC, et al. Myeloid sarcoma: clinico-pathologic, phenotypic and cytogenetic analysis of 92 adult patients. *Leukemia* 2007;21(2):340–350.
244. Bôle-Richard E, Fredon M, Biichlé S, et al. CD28/4-1BB CD123 CAR T cells in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Leukemia* 2020;34(12):3228–3241.
245. Ruminy P, Marchand V, Buchbinder N, et al. Multiplexed targeted sequencing of recurrent fusion genes in acute leukaemia. *Leukemia* 2016;30(3):757–760.
246. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, et al. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia. *Br J Haematol* 2009;145(5):624–636.

247. Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T. Sox4 functions as a positive regulator of β -catenin signaling through upregulation of TCF4 during morular differentiation of endometrial carcinomas. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2012;92(4):511–521.
248. Liao Y-L, Sun Y-M, Chau G-Y, et al. Identification of SOX4 target genes using phylogenetic footprinting-based prediction from expression microarrays suggests that overexpression of SOX4 potentiates metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2008;27(42):5578–5589.
249. Bandyopadhyay S, Harris DP, Adams GN, et al. HOXA9 Methylation by PRMT5 Is Essential for Endothelial Cell Expression of Leukocyte Adhesion Molecules. *Mol Cell Biol* 2012;32(7):1202–1213.
250. Schlesinger M, Bendas G. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *Int J Cancer* 2015;136(11):2504–2514.
251. Fears S, Chakrabarti SR, Nucifora G, Rowley JD. Differential expression of TCL1 during pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;135(2):110–119.
252. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(12):731–747.
253. Wotton D, Lake RA, Farr CJ, Owen MJ. The high mobility group transcription factor, SOX4, transactivates the human CD2 enhancer. *J Biol Chem* 1995;270(13):7515–7522.
254. de Rooij JDE, Beuling E, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Recurrent deletions of IKZF1 in pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2015;100(9):1151–1159.
255. Pagano L, Valentini CG, Grammatico S, Pulsoni A. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: diagnostic criteria and therapeutical approaches. *Br J Haematol* 2016;174(2):188–202.
256. Aoki T, Suzuki R, Kuwatsuka Y, et al. Long-term survival following autologous and allogeneic stem cell transplantation for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Blood* 2015;125(23):3559–3562.
257. Kharfan-Dabaja MA, Cherry M. Hematopoietic Cell Transplant for Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. *Hematol Oncol Clin North Am* 2020;34(3):621–629.
258. Kharfan-Dabaja MA, Lazarus HM, Nishihori T, Mahfouz RA, Hamadani M. Diagnostic and Therapeutic Advances in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm: A Focus on Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(7):1006–1012.
259. Kharfan-Dabaja MA, Al Malki MM, Deotare U, et al. Haematopoietic cell transplantation for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: a North American multicentre collaborative study. *Br J Haematol* 2017;179(5):781–789.
260. Unteregger M, Valentin A, Zinke-Cerwenka W, et al. Unrelated SCT induces long-term remission in patients with blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(6):799–802.
261. Laribi K, Denizon N, Ghnaya H, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: the first report of two cases treated by 5-azacytidine. *Eur J Haematol* 2014;93(1):81–85.
262. Philippe L, Ceroi A, Bôle-Richard E, et al. Bortezomib as a new therapeutic approach for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Haematologica* 2017;102(11):1861–1868.
263. Montero J, Stephansky J, Cai T, et al. Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm Is Dependent on BCL2 and Sensitive to Venetoclax. *Cancer Discov* 2017;7(2):156–164.

264. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia* 2011;25(7):1147–1152.
265. Kovtun Y, Jones GE, Adams S, et al. A CD123-targeting antibody-drug conjugate, IMG632, designed to eradicate AML while sparing normal bone marrow cells. *Blood Adv* 2018;2(8):848–858.
266. Bonifant CL, Szoor A, Torres D, et al. CD123-Engager T Cells as a Novel Immunotherapeutic for Acute Myeloid Leukemia. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2016;24(9):1615–1626.
267. Zhang X, Sun J, Yang M, Wang L, Jin J. New perspectives in genetics and targeted therapy for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Crit Rev Oncol Hematol* 2020;149:102928.
268. Bewersdorf JP, Stahl M, Zeidan AM. Immune checkpoint-based therapy in myeloid malignancies: a promise yet to be fulfilled. *Expert Rev Anticancer Ther* 2019;19(5):393–404.
269. Chen X, Liu S, Wang L, Zhang W, Ji Y, Ma X. Clinical significance of B7-H1 (PD-L1) expression in human acute leukemia. *Cancer Biol Ther* 2008;7(5):622–627.
270. Kong Y, Zhang J, Claxton DF, et al. PD-1(hi)TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cancer J* 2015;5:e330.
271. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 2015;372(4):311–319.
272. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, et al. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2016;34(23):2698–2704.
273. Zinzani PL, Santoro A, Gritti G, et al. Nivolumab Combined With Brentuximab Vedotin for Relapsed/Refractory Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma: Efficacy and Safety From the Phase II CheckMate 436 Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2019;JCO1901492.
274. Lindblad KE, Thompson J, Gui G, et al. Pembrolizumab and Decitabine for Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 2018;132(Suppl 1):1437–1437.
275. Xu J, Sun HH, Fletcher CDM, et al. Expression of Programmed Cell Death 1 Ligands (PD-L1 and PD-L2) in Histiocytic and Dendritic Cell Disorders. *Am J Surg Pathol* 2016;40(4):443–453.
276. Aung PP, Sukswai N, Nejati R, et al. PD1/PD-L1 Expression in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. *Cancers*;11(5):.
277. Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* 2015;12(5):453–457.
278. Liu Z, Dang E, Li B, et al. Dysfunction of CD19+CD24hiCD27+ B regulatory cells in patients with bullous pemphigoid. *Sci Rep*;8.
279. Martín-Martín L, López A, Vidriales B, et al. Classification and clinical behavior of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms according to their maturation-associated immunophenotypic profile. *Oncotarget* 2015;6(22):19204–19216.
280. Xiao W, Chan A, Waarts MR, et al. Plasmacytoid dendritic cell expansion defines a distinct subset of RUNX1 mutated acute myeloid leukemia. *Blood* [Epub ahead of print].

281. Dicker F, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Trisomy 13 is strongly associated with AML1/RUNX1 mutations and increased FLT3 expression in acute myeloid leukemia. *Blood* 2007;110(4):1308–1316.
282. Tang J-L, Hou H-A, Chen C-Y, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood* 2009;114(26):5352–5361.
283. Preudhomme C, Warot-Loze D, Roumier C, et al. High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. *Blood* 2000;96(8):2862–2869.
284. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999;23(2):166–175.
285. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia* 2016;30(11):2282.
286. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2002;2(7):502–513.
287. Kurokawa M, Hirai H. Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer Sci* 2003;94(10):841–846.
288. Morita K, Suzuki K, Maeda S, et al. Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects. *J Clin Invest* 2017;127(7):2815–2828.
289. Kamikubo Y. Genetic compensation of RUNX family transcription factors in leukemia. *Cancer Sci* 2018;109(8):2358–2363.
290. Mani R, Goswami S, Gopalakrishnan B, et al. The interleukin-3 receptor CD123 targeted SL-401 mediates potent cytotoxic activity against CD34+CD123+ cells from acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome patients and healthy donors. *Haematologica* 2018;103(8):1288–1297.
291. Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T, et al. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;122(18):3138–3148.
292. Mill CP, Fiskus W, DiNardo CD, et al. RUNX1-targeted therapy for AML expressing somatic or germline mutation in RUNX1. *Blood* 2019;134(1):59–73.

Titre : Etude génomique de la cohorte nationale de leucémies dérivées de cellules dendritiques plasmocytoïdes et hémopathies apparentées

Mots clés : leucémie, génétique, cellules dendritiques plasmocytoïdes, pDC, AS-DC, *RUNX1*

Résumé : Deux types d'hémopathies impliquent des cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDCs) : les leucémies à blastes dérivés de pDCs (LPDC) et les proliférations de pDCs matures associées à une hémopathie, dont les LAM-pDC lorsque l'hémopathie est une leucémie aiguë myéloïde (LAM). L'ontogénie des pDCs est complexe : leur origine myéloïde et/ou lymphoïde est incertaine et elles sont vraisemblablement constituées de plusieurs sous populations incluant des cellules nouvellement identifiées les cellules dendritiques AXL⁺ SIGLEC6⁺ (AS-DC). Grâce au réseau français LPDC, nous avons étudié des cas de LPDC et de LAM-pDC sur le plan génétique et phénotypique en considérant ces nouvelles données sur l'ontogénie des pDCs.

L'étude des LPDC démontre leur hétérogénéité, avec parfois des difficultés diagnostiques liées aux marqueurs aberrants parfois exprimés par les cellules néoplasiques. Les LPDC se caractérisent aussi par de nombreuses délétions génétiques d'oncogènes (ETV6, IKZF1, RB1 et NR3C1) et de gènes de réponse immune (cluster IFNA, IFNR1, CLEC4C). A cela s'associe des anomalies épigénétiques (TET2, ASXL1) et d'épissage (ZRSR2). Divers marqueurs évoquent une origine AS-DC mais certaines de ces anomalies sont liées à la leucémogénèse et non à l'ontogénèse, telle que la délétion 9p entraînant une expression diminuée des gènes codant

pour les interférons de type I ou l'expression du CD2 induite par SOX4. De plus, même si des marqueurs AS-DC ou lymphoïdes B sont retrouvés, le profil AS-DC est incomplet et seulement retrouvé dans certaines LPDC. Le programme transcriptionnel de ces hémopathies est également caractérisé par des dérégulations du cycle cellulaire et de SOX4, lequel active notamment TCF4, NRP1 et CD2.

L'étude de 15 cas de LAM-pDC, montre un excès de myéloblastes (CD45^{faible} CD34⁺ sans marqueurs pDC) associé à un excès de pDCs dont le phénotype est proche de pDCs physiologiques pour les niveaux d'expression des CD303, cTCL1 et CD123, avec absence d'expression du CD56. Ce profil les distingue clairement des blastes de LPDC. De plus, il existe un continuum de maturation des blastes vers les pDCs (perte du CD34, expression des CD45, CD123, CD303, CD304) et les monocytes, suggérant que les blastes conservent un potentiel de maturation à minima vers ces deux types cellulaires. Nous confirmons également la nature néoplasique des pDCs et leur origine clonale, avec les mêmes mutations dans les blastes, pDCs et monocytes. *RUNX1* est le gène le plus fréquemment muté (11 cas sur 15), et surtout, dans toutes les LAM0 évaluées, soutenant l'hypothèse d'un sous-type de LAM0 *RUNX1*-mutées associées à un excès de pDC, potentiellement issu d'un progéniteur à potentiel myéloïde et pDC.

Title : Genomic study of the French national cohort of Blastic plasmacytoid dendritic cell Neoplasms and related leukemias

Keywords : leukemia, genetics, plasmacytoid dendritic cells, pDC, AS-DC, *RUNX1*

Abstract: Neoplasms involving plasmacytoid dendritic cells (pDCs) include Blastic pDC Neoplasms (BPDCN) and mature pDC proliferations associated with myeloid malignancies, namely AML-pDC when the malignancy is an Acute Myeloid Leukemia (AML). The ontogeny of pDCs is complex: their myeloid and/or lymphoid origin is uncertain and they probably consist of several sub-populations including newly identified cells, the AXL⁺ SIGLEC6⁺ dendritic cells (AS-DCs). Through the French BPDCN network, we studied BPDCN and AML-pDC at the genetic and phenotypic level, integrating new data on pDC ontogeny.

We demonstrate the BPDCN heterogeneity, with sometimes diagnostic trap related to aberrant markers sometimes expressed by neoplastic cells. BPDCN are also characterized by numerous genetic deletions of oncogenes (ETV6, IKZF1, RB1 and NR3C1) and immune response genes (IFNA cluster, IFNR1, CLEC4C). This is associated with epigenetic (TET2, ASXL1) and splicing (ZRSR2) abnormalities. Various markers evoke an AS-DC origin but some of these abnormalities are related to leukemogenesis and not ontogenesis, such as the 9p deletion leading to decreased expression of genes encoding type I interferons or the expression of CD2

induced by SOX4. In addition, even if AS-DC or B lymphoid markers can be found, the AS-DC profile is incomplete and only found in some cases. The transcriptional program of BPDCN is also characterized by cell cycle and SOX4, which activates TCF4, NRP1 and CD2, notably.

The study of 15 cases of AML-pDC show an excess of myeloblasts (CD45^{low} CD34⁺) associated with an excess of pDC whose phenotype is close to physiological pDCs for expression levels of CD303, cTCL1, CD123 with the absence of CD56 expression. This profile clearly distinguishes them from blasts in BPDCN. Moreover, there is a continuous maturation from blasts to pDCs (loss of CD34, progressive expression of CD45, CD123, CD303, CD304) and to monocytes, suggesting that blasts retain maturation potential of a common progenitor to these two cell types. We also confirm the neoplastic nature of pDCs and their clonal origin, with the same mutations in blasts, pDCs and monocytes. *RUNX1* is the most frequently mutated gene (11 cases out of 15), and most importantly, in all evaluated M0-AML, raising the hypothesis of a subtype of *RUNX1*-mutated M0-AML associated with an excess of pDC, potentially related to a progenitor with myeloid and pDC potential.