



HAL
open science

Mécanismes moléculaires impliqués dans la rechute des leucémies aiguës lymphoblastiques T

Mathieu Simonin

► **To cite this version:**

Mathieu Simonin. Mécanismes moléculaires impliqués dans la rechute des leucémies aiguës lymphoblastiques T. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5092 . tel-04588934

HAL Id: tel-04588934

<https://theses.hal.science/tel-04588934>

Submitted on 27 May 2024

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

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

Université Paris Cité

École doctorale : Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies (n°561)

Spécialité : Hématologie

Laboratoire : Institut Necker Enfants Malades (INSERM U1151)

Équipe : Différenciation lymphoïde normale et pathologique

**Mécanismes moléculaires impliqués dans la
rechute des leucémies aiguës
lymphoblastiques T**

Par Mathieu SIMONIN

Thèse de doctorat

Dirigée par Vahid ASNAFI

Présentée et soutenue publiquement le 25.10.2022

Devant un jury composé de :

Madame le Professeur Judith LANDMAN PARKER, PU-PH, Sorbonne Université, Examinatrice

Madame le Docteur Dominique PAYET-BORNET, Ph.D, HDR, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Rapportrice

Madame le Professeur Virginie GANDEMER, PU-PH, Université de Rennes 1, Rapportrice

Monsieur le Professeur Nicolas BOISSEL, PU-PH, Université Paris Cité, Examinateur

Monsieur le Professeur Vahid ASNAFI, PU-PH, Université Paris Cité, Directeur de thèse

Résumé

Mécanismes moléculaires impliqués dans la rechute des leucémies aiguës lymphoblastiques T

Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) représentent environ 20% des LAL de l'enfant et de l'adulte. Malgré les progrès thérapeutiques récents elles demeurent associées à un pronostic plus sombre que les formes B notamment en cas de rechute. Ce constat s'explique d'une part en raison d'un arsenal thérapeutique plus restreint et d'autre part car les LAL-T sont des hémopathies présentant une grande hétérogénéité oncogénique rendant complexe leur individualisation en vue d'une stratification thérapeutique optimale.

Au cours de la dernière décennie nous avons pour la première fois établi une classification pronostique des LAL-T s'appuyant sur le profil d'altérations de 5 gènes ; *NOTCH1*, *FBXW7*, *N-K-RAS* et *PTEN*. Le développement des techniques de séquençage à haut débit (NGS, *Next Generation Sequencing*) au cours des dernières années a contribué à enrichir grandement nos connaissances sur l'oncogénèse T. Cette approche permettant de réaliser rapidement et de façon exhaustive l'analyse du profil d'altération d'un très grand nombre de gènes impliqués dans l'oncogénèse T.

Les travaux menés au cours de ma thèse se sont articulés autour de la mise en évidence de ces nouvelles altérations moléculaires impliquées dans les processus d'oncogénèse des LAL-T et de la survenue de rechutes. Nous avons ainsi pu identifier pour la première fois l'impact pronostic défavorable associé aux altérations du gène codant pour le facteur de transcription *IKZF1*, du gène régulateur épigénétique *IDH2* et du gène suppresseur de tumeur *TP53* dans les LAL-T. La mise en évidence de ces nouvelles altérations nous a conduit à proposer une nouvelle stratification moléculaire des LAL-T à l'heure du NGS. Cette nouvelle classification pronostique complexe s'appuie maintenant sur le profil d'altérations des gènes *NOTCH1*, *FBXW7*, *N-K RAS*, *PI3KCA*, *PIK3R1*, *PTEN*, *DNMT3A*, *TP53*, et *IKZF1*. D'un point de vue thérapeutique, l'identification de ces altérations pourraient également conduire à proposer des thérapies innovantes dans les LAL-T ; cibler spécifiquement les altérations d'*IDH1/2*, restaurer

l'activité de p53 tout en induisant également l'activation de la ferroptose avec l'APR-246 ou encore cibler les altérations de la voie PI3K.

Enfin, en s'appuyant sur nos observations précédentes ayant mises en évidence le pronostic favorable associé aux mutations de *NOTCH1* présentes dans environ 70% des LAL-T, nous avons cherché à expliquer ce paradoxe. Ainsi, nous avons démontré par différentes approches expérimentales complémentaires (notamment par l'utilisation de modèles murins de LAL-T exposés à de la chimiothérapie (CT) *in vivo* combinés à des approches en single-cell RNA-seq) que les LAL-T *NOTCH1* muté, sous pression de la CT, présentaient une diminution du taux de cellules initiatrices de leucémies (LIC) responsables de la rechute, alors que ce taux de LIC était augmenté chez les patients *NOTCH1* sauvage après exposition à la CT.

En favorisant la prolifération des cellules blastiques via c-MYC, l'activation de NOTCH1 sensibiliserait les LIC à l'activité de la CT conduisant ainsi à une réduction de leur proportion après exposition aux drogues cytotoxiques. Ce résultat contribue à expliquer la proportion de rechutes plus élevée observée dans le groupe de LAL-T *NOTCH1* sauvage et constitue une nouvelle approche thérapeutique innovante s'appuyant sur la susceptibilité à la CT induite par l'activation de cette voie oncogénique.

En conclusion, mes travaux ont conduit à l'identification de nouvelles altérations moléculaires impliquées dans les rechutes de LAL-T permettant d'établir une nouvelle stratification pronostique moléculaire. Dans le même temps, l'identification de ces nouvelles altérations mais également de la susceptibilité à la chimiothérapie induite par l'activation de la voie NOTCH1 offrent de nouvelles opportunités thérapeutiques pour ces hémopathies dont le pronostic reste très défavorable particulièrement en situation de rechute.

Mots clefs : Leucémies Aiguës Lymphoblastiques T (LAL-T), lymphome lymphoblastique T, rechute, NOTCH1, IKZF1, IDH2, TP53, Ferroptose, Leukemia Initiating Cell (LIC), PI3K, Broad domain.

Abstract:

Molecular mechanisms involved in the relapses of T cell acute lymphoblastic leukemia

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) account for approximately 20% of childhood and adult ALL. Despite recent therapeutic progress, T-ALL remain associated with a poorer prognosis than B-ALL, particularly at relapse. This is partly due to a more limited therapeutic armamentarium and partly because T-ALL are associated with a high degree of oncogenic heterogeneity, which makes their individualizations for optimal therapeutic stratification complex.

During the last decade we have for the first time established a prognostic classification of T-ALL based on the alteration profile of 5 genes; *NOTCH1*, *FBXW7*, *N-K-RAS* and *PTEN*. This stratification was based on the identification of each alteration by old sequencing techniques (SANGER). The development of high-throughput sequencing techniques (NGS, Next Generation Sequencing) in recent years has greatly enriched our knowledge of T oncogenesis. NGS approach allows the rapid and exhaustive analysis of the alteration profile of a very large number of genes involved in T oncogenesis.

The work carried out during my thesis focused on the identification of these new molecular alterations involved in the processes of T-ALL oncogenesis and relapse. We were thus able to identify for the first time the unfavorable prognostic impact associated with alterations of the transcription factor *IKZF1*, the epigenetic regulator *IDH2* and the tumor suppressor *TP53* in T-ALL. This new complex prognostic classification is now based on the alteration profile of the *NOTCH1*, *FBXW7*, *N-K RAS*, *PI3KCA*, *PIK3R1*, *PTEN*, *DNMT3A*, *TP53*, and *IKZF1* genes. From a therapeutic point of view, the identification of these alterations could also lead to propose innovative therapies in T-ALL; targeting *IDH1/2* alterations with specific inhibitors, or restoring p53 activity or priming ferroptosis induction with APR-246.

Finally, based on our previous observations that highlighted the favorable prognosis associated with *NOTCH1* mutations present in about 70% of T-ALL, we sought to explain this paradox. Thus, we demonstrated by different and complementary experimental approaches (in particular

by using mouse models of T-ALL exposed to chemotherapy *in vivo* and single cell RNA sequencing approaches) that mutated *NOTCH1* T-ALL, under chemotherapy pressure (CT), presented a decrease in the rate of leukemia-initiating cells (LIC) whereas this rate of LIC was increased in wild-type *NOTCH1* patients after exposure to CT.

By promoting the proliferation of blast cells via c-MYC, *NOTCH1* activation would sensitize LICs to the activity of CT, thus leading to a reduction in their proportion after exposure to cytotoxic drugs. This result helps to explain the higher proportion of relapses observed in the wild-type *NOTCH1* T-ALL group and constitutes an innovative therapeutic approach based on the CT susceptibility induced by the activation of this oncogenic pathway.

In conclusion, my work has led to the identification of new molecular alterations involved in relapsed T-ALL allowing to establish a new molecular prognostic stratification. At the same time, the identification of these new alterations but also the susceptibility to chemotherapy induced by the activation of the *NOTCH1* pathway offers new opportunities for this disease whose prognosis remains extremely unfavorable in particular at relapse.

Keywords : T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), T-cell lymphoblastic lymphoma, relapse, *NOTCH1*, *IKZF1*, *IDH2*, *TP53*, Ferroptosis, Leukemia Initiating Cell (LIC), *PI3K*, Broad domain.

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes sincères et respectueux remerciements aux membres du jury :

À Madame le Docteur Dominique Payet-Bornet et à Madame le Professeur Virginie Gandemer, vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs.

À Monsieur le Professeur Nicolas Boissel, je te remercie d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Merci pour ton aide et tes précieux conseils au cours de ces 4 années.

À Madame le Professeur Judith Landman Parker, tu me fais l'honneur d'être présidente de mon jury. Merci pour ta bienveillance et ton soutien depuis mon arrivée à Trousseau. La médecine est une histoire de rencontre déterminante, je peux en témoigner.

À Monsieur le Professeur Vahid Asnafi, après avoir dirigé ma Thèse de médecine et mon Master 2, te voilà directeur de ma Thèse de science. Que de chemin parcouru depuis ce jour, il y a maintenant presque 10 ans, où je suis rentré dans ton bureau plein de naïveté et après 5 minutes tu avais réussi à me convaincre qu'on pourrait traiter les LAL-T avec des thérapies différenciantes ! C'est probablement ce jour-là que j'ai décidé que je ne quitterai plus ton laboratoire.

À Madame le Professeur Elizabeth Macintyre, merci pour votre soutien depuis le commencement et au cours de toutes ces années. Sans vous je n'en serai pas là aujourd'hui.

À Monsieur le Professeur Leverger, je vous remercie pour votre confiance et votre soutien. Merci de m'avoir accueilli dans votre service. Merci pour la bienveillance dont vous faites preuve au quotidien envers l'ensemble des membres de votre équipe et qui contribue à rendre ce service si spécial.

À toute l'équipe du laboratoire d'Hématologie de l'hôpital Necker ; Patrick, Agatha, Mehdi, Mélanie, Charlotte, Layla, Lucien, Annabelle, Estelle, Aurore, Lucille, Thomas, Chantal, Fatiha et tous les autres.

Un grand merci à toi Ludovic, tu m'as fait découvrir le monde de la biologie lors de mon externat et ce fut une révélation. Tes dons en tant qu'enseignant et ton implication dans la transmission des connaissances sont probablement sans égal.

Merci à l'équipe des Guillaumes, sans vous rien n'aurait été possible.

À Marie-Émilie et Charlotte. C'est un vrai plaisir d'envisager la suite avec vous.

À la Ligue contre le Cancer, à Action Leucémie et à l'ITMO Cancer qui m'ont permis de financer ces 4 années de thèse.

À toute l'équipe du service d'Oncologie et d'Hématologie Pédiatrique de l'hôpital Trousseau.

À mes parents

À Pauline, Raphaël, Marie et Samuel

À mon grand-père

Liste des principales abréviations

5mC : 5-methylcytosine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

BET : Bromodomain and Extra-terminal motif

CIMP : CpG Island Methylator Phenotype

ChIP-seq : Chromatin Immuno-Precipitation – Sequencing

CIR : Cumulative Incidence of Relapse

CpG : cytosine-phosphate-guanine

CR: Complete Remission

DFS : Disease Free Survival

DN : Double Negative

DNMTs : DNA methyltransferases

DP : Double Positive

EFS : Event Free Survival

ETP : Early Thymic Progenitor

LAL-B : Leucémie Aiguë Lymphoblastique B

LAL-T : Leucémie Aiguë Lymphoblastique T

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

LBL-T : Lymphome Lymphoblastique T

LIC : Leukemic Initiating Cell

MRD : Minimal Residual Disease

NGS : Next Generation Sequencing

N/F : NOTCH1/FBXW7

NFRP : NOTCH1/FBXW7/ RAS/PTEN

OS : Overall Survival

PDX : Patient Derived Xenograft

PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2

RNA : Ribonucleic Acid

R/P : RAS/PTEN

SMD : Syndrome Myéloblastique

T-ALL : T cell acute lymphoblastic leukemia

WT : Wild Type

Sommaire

Résumé	2
Remerciements	6
Liste des principales abréviations	8
Sommaire	10
Table des Illustrations	12
Introduction	14
Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T)	14
I. Généralités sur les LAL-T	14
II. Oncogenèse des leucémies aiguës lymphoblastiques T	15
1. La classification des LAL-T à l'heure des techniques de séquençages à haut débit	15
2. Les LAL-T immatures et l'activation de la voie <i>IL7-JAK-STAT</i>	17
3. Les LAL-T TLX ou l'espoir d'une thérapie différenciante dans les LAL-T ?	19
4. Le groupe des LAL-T TAL/LMO	20
5. De l'identification des altérations moléculaires récurrentes dans les LAL-T au perfectionnement de la stratification thérapeutique et la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.	21
III. Rôle de la voie Notch1 dans l'oncogenèse T	22
1. Découverte de la voie de signalisation Notch	22
2. Mécanismes impliqués dans la signalisation de la voie Notch1	23
3. Rôle de Notch1 au cours la thymopoïèse :	26
4. Activation de Notch1 dans les LAL-T	27
5. Distribution des mutations de NOTCH1 selon l'oncogénétique et le phénotype des LAL-T	30
6. Conséquences fonctionnelles de l'activation de la voie NOTCH1.	31
Prise en charge et stratification des LAL	34
I. Prise en charge thérapeutique actuelle des LAL	34
1. Généralités sur la prise en charge des LAL	34
2. Facteurs pronostiques historiques dans les LAL	34
3. Les principes du traitement des LAL	39
II. Les spécificités de la prise en charge thérapeutique des LAL-T	42
1. Prise en charge des LAL-T pédiatriques/adolescents-jeunes-adultes (AJA)	42
III. Incidence des rechutes de LAL-T	47
IV. Mécanismes des rechutes dans les LAL-T	48
V. Pronostic des rechutes de LAL-T	51
VI. Place des nouvelles thérapeutiques dans les LAL-T réfractaires ou en rechutes (R/R)	51
VII. Comment améliorer la prédiction du risque de rechute dans les LAL-T ?	61
1. Critères historiques de stratification thérapeutique dans les LAL-T	61
2. Place de la MRD dans la prédiction de la rechute des LAL-T	62
3. Place de la biologie moléculaire dans la prédiction de rechute	62
De la mise en évidence des altérations oncogéniques au développement de nouvelles thérapies ciblées dans les LAL-T	69
I. La Ferroptose comme nouveau levier thérapeutique dans les LAL-T	69
1. Généralités sur le concept de Ferroptose	69
2. Ferroptose et cancer	71
3. APR-246 : développement et mécanismes d'action	72
4. Conclusion Ferroptose et LAL-T	74
II. La voie PI3K/AKT : une nouvelle cible thérapeutique dans les LAL-T	75
1. Généralités sur la voie PI3K-AKT	75
2. Voie PI3K-AKT en condition physiologique	75
3. Conséquences métaboliques liées à l'activation de la voie PI3K/AKT	76

4.	Activation de la voie PI3K-AKT dans les LAL-T	77
5.	Conclusion PI3K et LAL-T	78
III.	Identification et ciblage des cellules initiateuses de leucémies dans les LAL-T	79
1.	Le concept de cellules souches cancéreuses (CSCs) en oncologie	79
2.	Mise en évidence des LICs dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)	80
3.	Identification des LIC dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)	81
4.	Caractérisation fonctionnelle des LIC dans les LAL.	82
5.	Impact de NOTCH1 sur les cellules initiateuses de leucémies (LIC)	86
6.	Interplay NOTCH1 et MYC dans les LAL-T	87
	Définitions des objectifs du travail de thèse	93
	Résultats	94
	Partie 1) À la recherche de nouveaux facteurs pronostiques dans les LAL-T	95
	Article 1. Exploration des altérations d' <i>IKZF1</i> dans les LAL-T	95
	Article 2. Impact pronostique des mutations d' <i>IDH1/2</i> dans les LAL-T	117
	Article 3. Vers une nouvelle stratification moléculaire dans les LAL-T	134
	Partie 2) De l'identification des altérations oncogéniques dans les LAL-T à la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.	172
	Article 4. <i>TP53</i> , NOTCH1 et Ferroptose dans les LAL-T	172
	Article 5. Cibler les altérations de la voie PI3K/AKT dans les LAL-T	220
	Article 6. Cibler les LAL-T <i>NOTCH1/FBXW7^{WT}</i>	262
	Discussion, perspectives et conclusions	295
	Vers une stratification moléculaire intégrée dans les LAL-T combinant les données mutationnelles, transcriptomiques, épigénétiques et structurales.	295
	Améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la rechute des LAL-T.	302
	Approche translationnelle en lien avec la mise en évidence des altérations moléculaires dans les LAL-T.	306
	Annexes	310
	Annexe 1) Exploration des altérations de <i>PTPN2</i> dans les LAL-T	311
	I. Présentation du travail : Impact des anomalies de <i>PTPN2</i> dans les LAL-T	311
	Annexe 2) Exploration des altérations épigénétiques dans les LAL-T	321
	I. Généralités sur les processus de régulations épigénétiques :	321
	Modifications principales impliquées dans la régulation épigénétique	321
	II. Présentation du travail : Analyse des marques de méthylation H3K4me3 dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T.	327
	Annexe 3) Analyse comparative du paysage mutationnel des LAL-T vs LBL-T	345
	I. Lymphomes lymphoblastiques T et leucémies aiguës lymphoblastiques T : deux noms pour une seule maladie ?	345
	II. Présentation du travail : LAL-T vs LBL-T	349
	Bibliographie	361

Table des Illustrations

FIGURE 1 LES LAL-T COMME MODELE D'ONCOGENESE THYMIQUE.	16
FIGURE 2. ALTERATIONS DE LA VOIE IL7/JAK/STAT DANS LES LAL-T.	17
FIGURE 3 ALTERATIONS PRC2 ET CDKN2A/B DANS LES LAL-T.	19
FIGURE 4. ALTERATIONS DE LA VOIE NOTCH1 ET PI3K/AKT DANS LES LAL-T.....	21
FIGURE 5 HISTORIQUE DE DECOUVERTE DE LA VOIE NOTCH1 (ZHOU ET AL., 2022)	23
FIGURE 6. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH1	24
FIGURE 7 INTERACTOME DE NOTCH1	26
FIGURE 8. ROLE DE NOTCH1 AU COURS DE LA THYMOPOÏESE.....	27
FIGURE 9 LES DIFFERENTES MUTATIONS RESPONSABLES D'UNE ACTIVATION DE LA VOIE NOTCH1 DANS LES LAL-T.....	28
FIGURE 10 PREVALENCE DES MECANISMES CONDUISANT A UNE ACTIVATION CONSTITUTIVE DE LA VOIE NOTCH1 DANS LES LAL-T	30
FIGURE 11 DISTRIBUTION PREFERENTIELLE DES ALTERATIONS SELON L'ONCOGENETIQUE DANS LES LAL-T	31
FIGURE 12 FREQUENCE DES ALTERATIONS CHROMOSOMIQUES OBSERVEES DANS LES LAL-B ADULTES ET PEDIATRIQUES (MOORMAN, 2016).....	36
FIGURE 13 FACTEURS PRONOSTIQUES DANS LES LAL-B ET T (TEACHEY ET PUI 2019).....	36
FIGURE 14 MIS EN PARALLELE DE L'EVOLUTION DU PRONOSTIC DES LAL AU COURS DES 50 DERNIERES ANNEES AVEC LES DIFFERENTES AVANCEES REALISEES DANS LE CHAMP DE LA BIOLOGIE.	39
FIGURE 15 LES GRANDS PRINCIPES DU TRAITEMENT DES LAL (SIMONIN ET AL., 2019B).....	41
FIGURE 16 PROTOCOLES THERAPEUTIQUES RECENTS DANS LES LAL-T PEDIATRIQUES (SHIRAZ ET AL., 2021)	42
FIGURE 17 PRINCIPES DE TRAITEMENT DES LAL-T SELON LES APPROCHES NORD-AMERICAINES ET BRITANNIQUES (TEACHEY AND O'CONNOR, 2020).....	46
FIGURE 18 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EVOLUTION CLONALE DES LAL-T ENTRE LE DIAGNOSTIC ET LA RECHUTE.....	49
FIGURE 19 PAYSAGE MUTATIONNEL A LA RECHUTE DES LAL-T.....	50
FIGURE 20 IMPACT PRONOSTIQUE DES MUTATIONS DE TP53, MSH6, USP7 ET DES MUTATIONS DE N-K-RAS A LA RECHUTE.....	50
FIGURE 21 CLASSIFICATION EN GROUPE DE RISQUE DES RECHUTES DE LAL.....	51
FIGURE 22 REPRESENTATION DES NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES DANS LES LAL-T (CORDO' ET AL., 2021)	54
FIGURE 23 IMPACT DU STATUT NOTCH1/FBXW7 DANS LES COHORTES LALA-94 ET GRAALL03 (141 PATIENTS AU TOTAL, 101 PATIENTS NOTCH1/FBXW7 ^{MUT} ET 40 PATIENT NOTCH1/FBXW7 ^{WT}) (ASNAFI ET AL., 2009).....	63
FIGURE 24 IMPACT DU STATUT NOTCH1/FBXW7/RAS/P TEN DANS LES COHORTES GRAALL03 ET GRAALL05 (TRINQUAND ET AL., 2013B).....	64
FIGURE 25 IMPACT DU CLASSIFER NFRP DANS LA COHORTE PEDIATRIQUE DU FRALLE 2000T ET MISE EN EVIDENCE DE L'IMPACT DU TAUX DE GB ET DE LA MRD EN ASSOCIATION AVEC LE STATUT NFRP (PETIT ET AL., 2018).	65
FIGURE 26 METANALYSE EVALUANT L'IMPACT DU STATUT NOTCH1/FBXW7 DANS LES DIFFERENTES ETUDES INTERNATIONALES A LA FOIS PEDIATRIQUES ET ADULTES (R.-B. LIU ET AL., 2017)	66
FIGURE 27 APPLICABILITE DU CLASSIFER NFRP ET SA COMBINAISON AVEC LA MRD ET LE TAUX DE GB AU DIAGNOSTIC DANS LE PROTOCOLE UKALL03 PAR RAPPORT AU FRALLE2000 (EN ROUGE) (TAJ ET AL., 2022)	67
FIGURE 28 PRINCIPAUX PROCESSUS METABOLIQUES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE LA FERROPTOSE ET DE L'ACTIVITE DE GPX4.	70
FIGURE 29 VULNERABILITE A LA FERROPTOSE DANS LES CANCERS.....	71
FIGURE 30 REPRESENTATION DES PRINCIPAUX INDUCTEURS DE FERROPTOSE ET LEURS CIBLES.....	72
FIGURE 31 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA BALANCE GSH/ROS/FERROPTOSE SELON L'ABSENCE OU LA PRESENCE D'APR-246.....	73
FIGURE 32 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE PI3K/AKT	76

FIGURE 33 CONSEQUENCES METABOLIQUES SECONDAIRES A L'ACTIVATION DE LA VOIE PI3K (HOXHAJ AND MANNING, 2020)	77
FIGURE 34 ALTERATIONS DE LA VOIE PI3K/AKT DANS LES LAL-T (GUTIERREZ ET AL., 2009)	78
FIGURE 35 LE MODELE DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSE SELON JOHN DICK	81
FIGURE 36 PRINCIPE DU MARQUAGE PAR CFSE DES BLASTES DE LAL ET SUIVI DE LA PROLIFERATION POUR SELECTIONNER LA POPULATION LRC (LABEL RETAINING CELL)	83
FIGURE 37 ÉPREUVES DE RETRANSLANTATIONS DES LRC ET DES NON-LRC DANS DES MODELES MURINS. .	84
FIGURE 38 CHIMIORESISTANCE DES LRC DANS LES LAL	84
FIGURE 39 ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE A L'ECHELLE UNICELLULAIRE DES LRC VS NON-LRC	85
FIGURE 40 LES LRC PARTAGENT DE NOMBREUSES SIMILITUDES AVEC LES BLASTES DE MRD	86
FIGURE 41 PLASTICITE DES LIC DANS LES LAL	86
FIGURE 42 MYC POSSEDE UNE POSITION CENTRALE DANS LES REGULATEURS DES RESEAUX ONCOLOGIQUES	88
FIGURE 43 INTERCONNEXION ENTRE NOTCH1 ET MYC DANS LES LAL-T	89
FIGURE 44 ANALYSE DES CONSEQUENCES D'UN KO DE NME DANS UN MODELE DE LEUCEMIE ΔE-NOTCH1	90
FIGURE 45 L'INHIBITION DE LA GSK-3β STABILISE MYC ET AUGMENTE LA CHIMIOSENSIBILITE DES LIGNEES DE LYMPHOMES B ...	91
FIGURE 46 ANALYSE DU PROFIL DE METHYLATION DE L'ADN EN EPIC ARRAY CHEZ 143 LAL-T ADULTES	296
FIGURE 47 IMPACT PRONOSTIQUE DU PROFIL DE METHYLATION DANS LES LAL-T (NOPHO)	297
FIGURE 48 PROPOSITION DE CLASSIFIER TRANSCRIPTOMIQUE DANS LES LAL-T	298
FIGURE 49 CLASSIFIER TRANSCRIPTOMIQUE DANS LES LL-T	299
FIGURE 50 PROFIL D'ALTERATIONS EN TERME COPY NUMBER VARIANT (CNV) DANS LES LAL-T ADULTES ET PEDIATRIQUES DANS UNE COHORTE DE 307 LAL-T ANALYSEES EN CYTOSCAN™ HD ARRAY.	300
FIGURE 51 IMPACT EN ANALYSE UNIVARIE DES ALTERATIONS DE TYPE CNV SUR LA SURVIE GLOBALE DANS UNE COHORTE DE 307 LAL-T ANALYSEES EN CYTOSCAN™ HD ARRAY.	300
FIGURE 52 PROFIL TEMPOREL DES RECHUTES DE LAL-T AU SEIN DE NOTRE COHORTE DE COUPLES DE LAL-T AU DIAGNOSTIC ET A LA RECHUTE.	303
FIGURE 53 ANALYSE DU PROFIL MUTATIONNEL ENTRE LE DIAGNOSTIC (D) ET LA RECHUTE (R) DANS LES LAL-T	303
FIGURE 54 ANALYSE COMPARATIVE ENTRE LE D ET LA R DU PROFIL DE REARRANGEMENT IGH/TCR	304
FIGURE 55 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES DE (DE) METHYLATIONS DE L'ADN DANS LES LAL-T	322
FIGURE 56 MODIFICATIONS EPIGENETIQUES AFFECTANT LES HISTONES CONDUISANT A UNE MODULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE.	324
FIGURE 57 LES MARQUES DE METHYLATION EN H3K4 ET LEURS DISTRIBUTIONS DANS LE GENOME	325
FIGURE 58 DISTRIBUTION NON ALEATOIRE DES MARQUES H3K4ME3. DISTINCTION ENTRE "PEAK" ET "BROAD DOMAIN » DES MARQUES H3K4ME3	326
FIGURE 59 HYPOTHESES SUR L'ORIGINE ET LE DEVELOPPEMENT DES LBL-T ET DES LAL-T	346
FIGURE 60 IMMUNOPHENOTYPE DES LAL-T VS LBL-T	346
FIGURE 61 COMPARAISON DES ALTERATIONS ONCOGENIQUES ENTRE LES LBL-T ET LES LAL-T	347
FIGURE 62 ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE COMPARATIVE LBL-T VS LAL-T	348

Introduction

Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T)

I. Généralités sur les LAL-T

Dans le champ de l'hématologie, les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) conservent une place à part. Si la majorité des hémopathies ont vu leurs pronostics s'améliorer ces dernières décennies grâce au développement et à la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques telles que l'immunothérapie avec notamment le développement des CAR-T cells, les LAL-T restent associées à un pronostic relativement sombre.

Classiquement les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) se définissent comme des hémopathies agressives et hétérogènes caractérisées par l'expansion clonale d'un progéniteur lymphoïde T bloqué à un stade plus ou moins précoce au cours de son processus de différenciation thymique (Asnafi et al., 2003). Ce sont des hémopathies rares puisqu'elles représentent environ 20% des LAL de l'enfant et de l'adulte (Hunger and Mullighan, 2015; Teachey and Pui, 2019).

Leur traitement actuel repose sur l'administration d'une polychimiothérapies, modifiée et optimisée aux grés des protocoles successifs et permettant à ce jour d'obtenir une survie globale de l'ordre de 70 à 80% (Petit et al., 2018; Trinquand et al., 2013a). Ces taux de survie élevés doivent cependant être mis en perspective avec la forte incidence des rechutes (20-40%) associées à une évolution très défavorable (survie inférieure à 20%). Ce pronostic particulièrement sombre s'explique en partie par l'acquisition d'une chimiorésistance secondaire qui place le clinicien dans une situation d'impasse thérapeutique au moment de la rechute.

Contrairement aux formes B, les LAL-T ne disposaient pas, jusqu'à encore récemment, de critères moléculaires robustes permettant une stratification du risque au diagnostic. Ainsi, depuis la mise en évidence de l'impact pronostique associé au statut *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* (*NFRP*) dans les LAL-T de l'adulte, celui-ci est maintenant intégré dans la stratification du risque de certains protocoles de LAL-T de l'adulte. Alors que l'impact du classifieur *NFRP* ait été également rapporté chez l'enfant dans le protocole FRAALLE2000T (et dans d'autres cohortes pédiatriques internationales) il n'est pas, à ce jour, pris en compte dans la stratification thérapeutique des protocoles pédiatriques. (Lepretre et al., 2016; Petit et al., 2018; Trinquand et al., 2013a)

Sur le plan des thérapies innovantes, les LAL-T, contrairement à la majorité des hémopathies malignes en général et des LAL-B en particulier, n'ont que peu bénéficié des avancées récentes réalisées dans le domaine de l'immunothérapie et des thérapies ciblées. La place des anticorps monoclonaux (antiCD38 notamment) reste à définir et la recherche de stratégies de contournement des conséquences induites par le développement de CAR T-cell dirigées contre les lymphoblastes T (aplasie profonde de la lignée lymphoïde T et lutte fratricide entre les CAR T-cell) freine le développement de cette approche, pourtant prometteuse, dans les LAL-T..

Ainsi, l'objectif de la recherche est double dans le champ des LAL-T ; i) il est urgent d'affiner l'identification, *a priori*, des patients à risque de rechute pour proposer dès le diagnostic une intensification thérapeutique adaptée voire une thérapie ciblée, ce qui impose *in fine* ii) la mise en évidence des altérations oncogéniques, notamment celles acquises et/ou sélectionnées à la rechute, associées à un risque de rechute et/ou pouvant constituer de potentielles cibles thérapeutiques innovantes qui font actuellement défaut dans la prise en charge des LAL-T.

II. Oncogenèse des leucémies aiguës lymphoblastiques T

1. La classification des LAL-T à l'heure des techniques de séquençages à haut débit

La classification historique des LAL-T reposait sur l'analyse de l'expression de marqueurs phénotypiques présents à la surface des lymphoblastes T. Ces marqueurs de différenciation sont les témoins de l'engagement et de la maturation lymphocytaire thymique ; « *immature* », « *pre- $\alpha\beta$ /early-cortical* » et mature ou « *late cortical* » par analogie avec le développement lymphoïde physiologique (Figure 1) (Bene et al., 1995). Les LAL-T présentent donc un certain nombre de caractéristiques les rapprochant des progéniteurs T physiologiques dont elles dérivent. Ainsi les LAL-T « *immatures* » sont des lymphoblastes dépourvus de TCR de surface et de chaîne TCR β intracytoplasmique provenant probablement de précurseurs thymiques T non restreints, les LAL-T « *pre- $\alpha\beta$ /early cortical* » sans TCR de surface mais présentant un pré-TCR qui correspondent à des cellules en cours ou en post β -sélection exprimant des marqueurs corticaux (CD1a) et enfin les LAL-T « *matures* » exprimant un TCR de surface ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$).

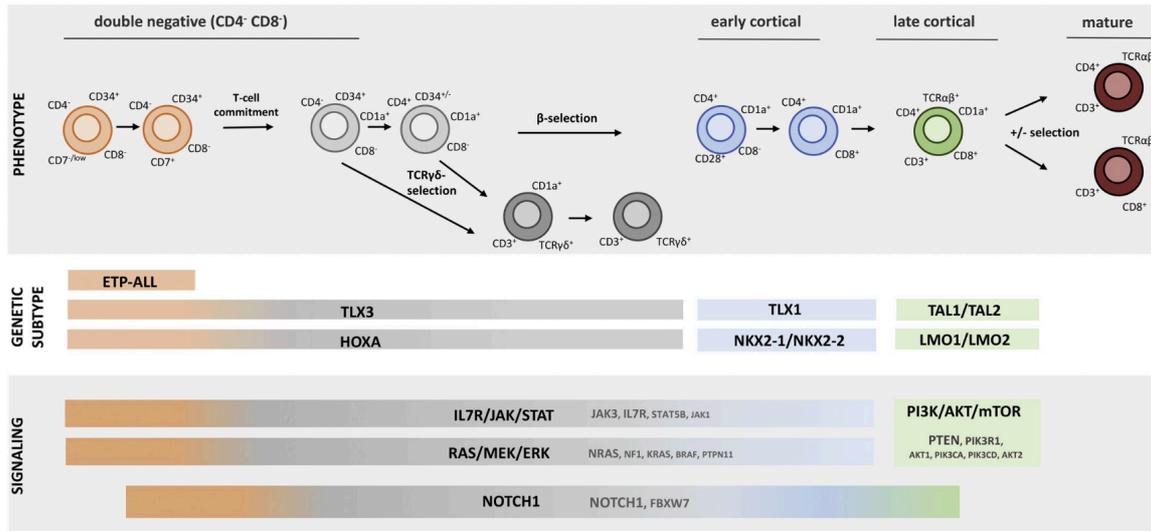


Figure 1 Les LAL-T comme modèle d'oncogenèse thymique.

Représentation schématique du développement T normal chez l'homme avec en corollaire les différents sous-types génétiques moléculaires des LAL-T. Les premières classifications phénotypiques des LAL-T reposaient sur l'analogie entre le développement thymique physiologique et les caractéristiques phénotypiques des LAL-T conduisant ainsi à la distinction de 3 groupes de LAL-T définis selon leur degré de différenciation (immature ou *double négatif*, early cortical et late cortical ou mature). Chacun des sous-types de LAL-T présentent en réalité un paysage mutationnel spécifique et un oncogène driver définis (*TLX1/3*, *TAL1*, *HOXA*...). (De Smedt et al., 2019)

Le développement rapide des techniques de cytogénétiques et de biologie moléculaire notamment de séquençage à haut débit (*NGS*, *Next generation Sequencing*) au cours des deux dernières décennies ont rendu possible l'identification de certaines dérégulations oncogéniques qui affectent, dans le cas des LAL-T, principalement des facteurs de transcription exprimés de façons ectopiques puisque faisant suite à des altérations géniques.

A l'heure actuelle les LAL-T peuvent être subdivisées en trois groupes principaux présentant chacun des mécanismes de dérégulations spécifiques expliquant leur signature transcriptomique propre ayant permis leur subdivision initiale, elle-même à présent remplacé par l'analyse du paysage mutationnel et délétionnel (Ferrando et al., 2002).

On distingue ainsi i) les LAL-T immatures (avec ou sans profil *ETP* pour *Early-Thymic Progenitor*), ii) les LAL-T avec dérégulations des gènes à homéodomains ou *HOX* (*TLX1* et *TLX3* principalement) et iii) les LAL-T matures ou *TAL/LMO*. De façon remarquable, chacun de ces 3 groupes se caractérise par un profil d'altérations relativement spécifiques dont certaines pourraient constituer de potentielles cibles thérapeutiques.

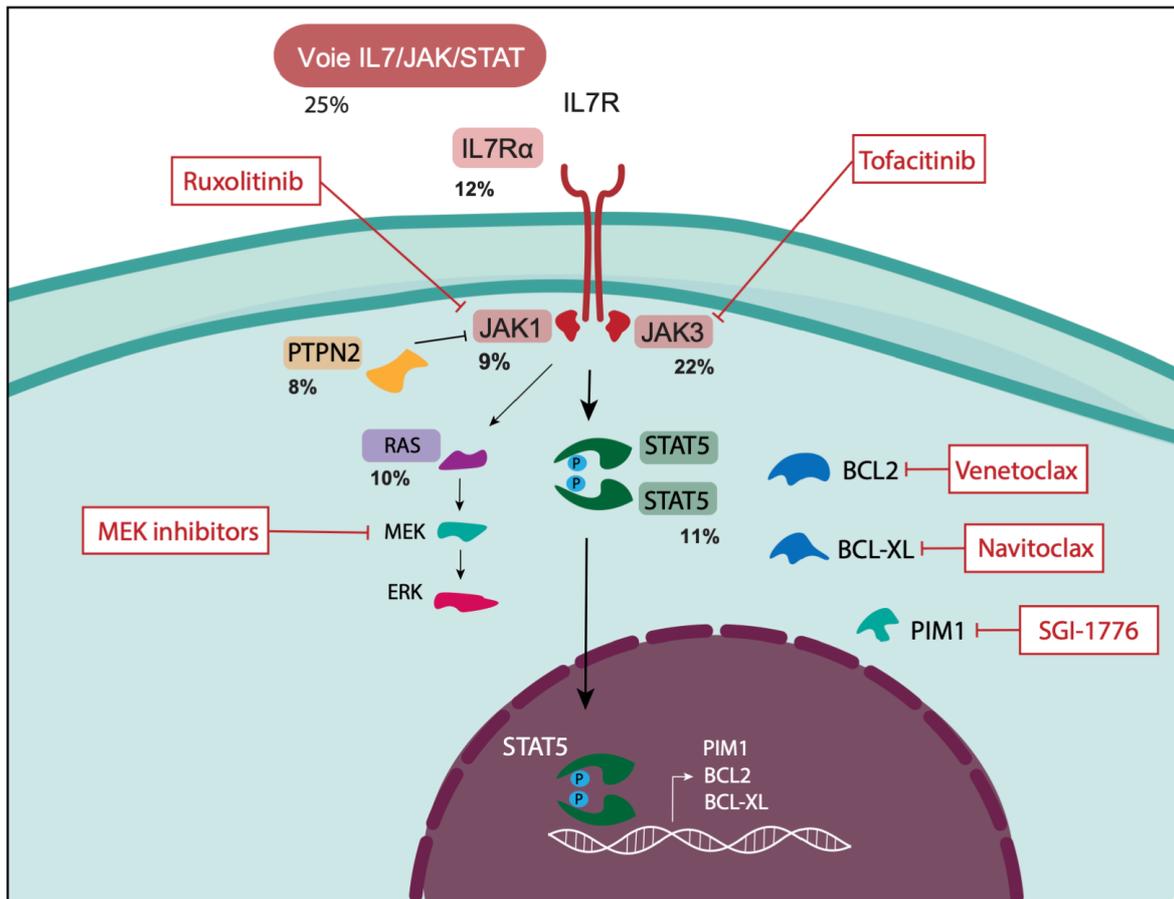


Figure 2. Altérations de la voie IL7/JAK/STAT dans les LAL-T.

La voie IL7/JAK/STAT est dérégulée dans près de 25% des LAL-T. Différentes mutations gains de fonctions affectant les effecteurs de cette voie ont été rapportées (IL7Rα, JAK1 et JAK3 ou STAT5B). L'activation de la voie IL7 conduit à la surexpression de protéines anti-apoptotiques comme BCL-2 et BCL-XL. L'association d'inhibiteurs de JAK avec des molécules ciblant BCL-2 pourrait constituer une approche thérapeutique innovante dans les LAL-T IL7 dérégulées. (Simonin and Asnafi, 2021).

2. Les LAL-T immatures et l'activation de la voie *IL7-JAK-STAT*

La classification OMS de 2016 définissait déjà une sous-catégorie de LAL-T immature regroupée sous le terme d'*ETP* sur la base de marqueurs phénotypiques spécifiques (absence des marqueurs T CD1a et CD8 et expression absente ou faible de CD5) associée à des marqueurs d'immaturité et/ou myéloïde (CD33, CD13, CD34...). Au-delà de cette distinction phénotypique, les LAL-T-*ETP* possèdent une signature transcriptomique spécifique au sein des LAL-T (Coustan-Smith et al., 2009), proche des progéniteurs myéloïdes et des cellules souches hématopoïétiques avec une forte expression de gènes impliqués dans l'auto-renouveaulement (*LMO2*, *LYL1* et *HHEX*) et dans les processus anti-apoptotiques comme BCL2. Les mécanismes conduisant à une surexpression de BCL2 dans les LAL-T *ETP* pourrait s'expliquer par une dérégulation préférentielle de la voie *IL7/JAK/STAT* dans cette catégorie de LAL-T, BCL2 étant une cible transcriptionnelle en aval de l'activation de STAT5 (Figure 2).

De façon notable, les mutations activatrices de *NOTCH1/FBXW7* et les altérations de *CDKN2A/2B* qui affectent environ 80% des LAL-T sont significativement moins fréquentes dans les LAL-T immatures. En revanche les altérations affectant certaines kinases de la voie IL7 comme *IL7R*, *JAK1*, *JAK3* et *STAT5B* (Kim et al., 2020) ou les mutations de facteurs de transcription impliqués dans la lymphopoïèse tels que *RUNX1*, *ETV6* et *IKZF1* (Simonin et al., 2020) et les altérations de régulateurs épigénétiques comme *DNMT3A* (Bond et al., 2019) et *IDH2* ou encore du complexe PRC2 (Andrieu et al., 2021) sont plus fréquentes dans les LAL-T immatures.

Certaines LAL-T immatures sont également associées à des dérégulation des gènes *HOXA* (*CALM-AF10*, *SET-NUP214*, remaniements *MLL*) associées à une corticoresistance et un risque de rechute accru (Bond et al., 2016).

D'un point de vue thérapeutique, la voie *IL7-JAK-STAT-BCL2* constitue une cible de choix en raison de l'existence de nombreuses molécules spécifiques disponibles (**Figure 2**). Ainsi l'association d'un inhibiteur de JAK comme le Ruxolitinib (anti-JAK1/2) ou le Tofacitinib (anti-JAK1/3) avec un inhibiteur de BCL2 (Venetoclax) pourrait constituer une proposition thérapeutique pertinente chez les patients atteints d'une LAL-T "*IL7 dérégulée*" en situation de rechute (Cabannes et al., 2019). Les mutations d'*IDH2*, associées à un mauvais pronostic, pourraient également bénéficier d'une thérapeutique ciblée (AG-221) au regard des résultats encourageants rapportés dans les leucémies aiguës myéloïdes (Stein et al., 2017).

La mise en évidence d'altérations épigénétiques ouvre un nouveau champ d'exploration dans l'oncogenèse des LAL-T mais apporte également l'espoir de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, après avoir dressé une cartographie des sous-types des LAL-T selon leur profil de méthylation global de l'ADN, nous avons mis en évidence un sous-contingent de LAL-T au profil hyperméthylé, correspondant principalement à des LAL-T immatures *HOXA en trans* (*SET-NUP214*, *MLL10* et *MLL*). Dans des modèles murins ces LAL-T associées à un profil hyperméthylé présentent une plus grande sensibilité aux agents déméthylants comme l'Azacitidine. De plus, les altérations des différents membres du complexe régulateur PRC2 que sont *SUZ12*, *EZH2* et *EED* concernent près de 25% des LAL-T. Ces altérations conduisent à une perte de fonction du complexe PRC2 qui possède une activité physiologique de régulation transcriptionnelle via la création de marque épigénétique répressive (H3K27me3). Ainsi la perte de fonction de ce complexe via le recrutement des protéines BET (*Bromodomain and Extraterminal*) se traduit par une modification du programme transcriptionnelle cellulaire et par

notamment la réactivation de gènes normalement exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques. Or, il existe des inhibiteurs spécifiques des BET protéines qui pourraient constituer une opportunité thérapeutique innovante dans un contexte de LAL-T "*PRC2 altéré*". Ces molécules sont en cours d'évaluation préclinique (JQ1 et OTX015 notamment) (Figure 3).

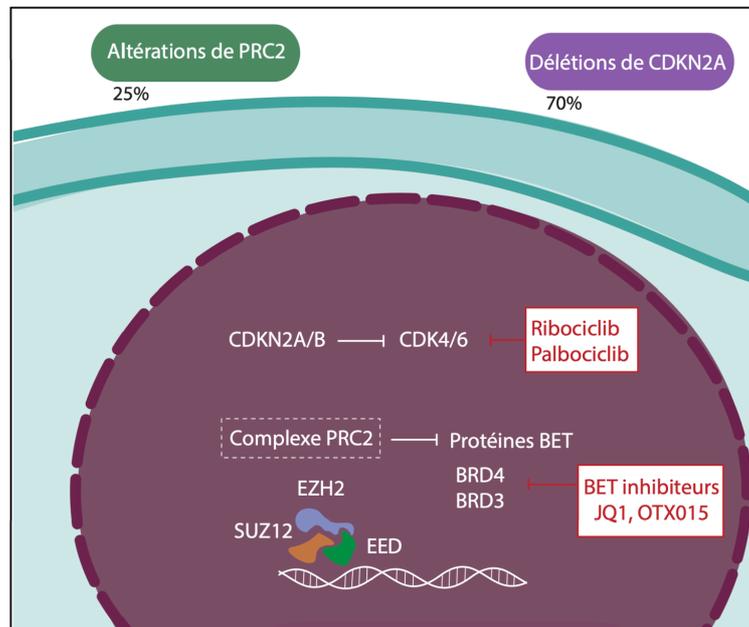


Figure 3 Altérations du complexe PRC2 et de *CDKN2A/B* dans les LAL-T.

Les altérations du complexe PRC2 (EZH2, EED, SUZ12) sont retrouvées dans près de 25% des LAL-T. Les modifications épigénétiques induites par la perte de fonction du complexe PRC2 pourraient être corrigées par le recours à des hypométhylants ou des inhibiteurs des BET protéines. Les délétions de *CDKN2A/B* sont très fréquentes (>80%) dans les LAL-T et conduisent à une levée d'inhibition des cyclines kinases CDK4/6 qui pourraient être ciblées par des inhibiteurs spécifiques. (Simonin and Asnafi, 2021).

3. Les LAL-T TLX ou l'espoir d'une thérapie différenciante dans les LAL-T ?

Les dérégulations des gènes à homéodomaines (*HOX*) *TLX1* et *TLX3* font parties des altérations les plus fréquemment retrouvées dans les LAL-T.

L'expression des protéines *TLX1* et *TLX3* reposent sur des altérations chromosomiques affectant les gènes *TLX1/3* conduisant ainsi à une expression ectopique de ces protéines au cours de la lymphopoïèse. Nous avons précédemment identifié que les protéines *TLX*, via l'interaction avec le facteur de transcription *ETS1*, étaient en mesure de se fixer sur l'Enhancer- α et compromettre le réarrangement du *TCR α* conduisant à une impossibilité d'expression du *TCR $\alpha\beta$* et un arrêt du développement au moment de la β -sélection contribuant ainsi au processus d'oncogenèse par l'acquisition successive d'altérations oncogéniques (Dadi et al., 2012). Ce blocage du réarrangement *TCR α* expliquer aussi le biais conduisant à la surreprésentation des LAL-T $\gamma\delta$ au sein du groupe des LAL-T *TLX1/3*.

D'un point de vue thérapeutique ce blocage du processus de différenciation peut être contourné de deux façons, soit via l'abrogation de l'expression de TLX1/3, soit en activant les voies d'aval du TCR $\alpha\beta$. Dans les deux cas on assiste à une reprise de la différenciation des lymphoblastes suivie d'une mort cellulaire massive par apoptose dont les caractéristiques se rapprochent du processus de sélection négative physiologiquement observé au cours de la thymopoïèse et qui est obtenu en cas d'activation excessive du TCR et de ses voies d'aval lorsque celui-ci interagit de façon supra-physiologique avec les antigènes du soi, prévenant ainsi les phénomènes d'auto-immunité.

Induire un signal de sélection négative via la stimulation du TCR/CD3 des lymphoblastes TCR(+) est à la base de travaux actuels visant à activer la voie de signalisation en aval du TCR (Figure 4) afin de conduire au rétablissement d'un signal de mort cellulaire "physiologique" (Trinquand et al., 2016). Des résultats préliminaires particulièrement encourageants quant à l'utilisation d'un anti-CD3 modifié sur des modèles murins de LAL-T exprimant un TCR a été rapporté récemment (Tran Quang et al., 2020).

4. Le groupe des LAL-T TAL/LMO

Ce sous-groupe de LAL-T matures représente près de 50% des cas pédiatriques et se définit par l'expression ectopique de *TAL1*, *TAL2*, *LYL1*, *LMO1*, *LMO2* ou *LMO3* (parfois suite à des réarrangements qui impliquent les locus du TCR β ou du TCR α/δ). Sur le plan phénotypique ces LAL-T *TAL/LMO* se rapprochent des étapes de développement « *late cortical* » (CD4 ou CD8 simple positif). Alors que les LAL-T immatures présentent principalement des dérégulations de la voie *IL7-JAK-STAT*, les LAL-T matures se caractérisent par la prédominance d'altérations affectant la voie *PI3K-AKT-mTOR*, notamment via la perte de fonction du régulateur négatif *PTEN* mais également via l'existence de mutations gain de fonction du récepteur *PI3K* (région régulatrice ; *PIK3R1* et région à activité catalytique *PIK3CA*), ou plus rarement du gène *AKT1*. Sur le plan thérapeutique, la voie *PI3K-AKT-mTOR* dispose d'un certain nombre d'inhibiteurs spécifiques disponibles (Figure 1C) ciblant soit directement les mutations de *PIK3CA* (BYL719) ou inhibant l'effecteur *mTOR* (Temsirrolimus, everolimus).

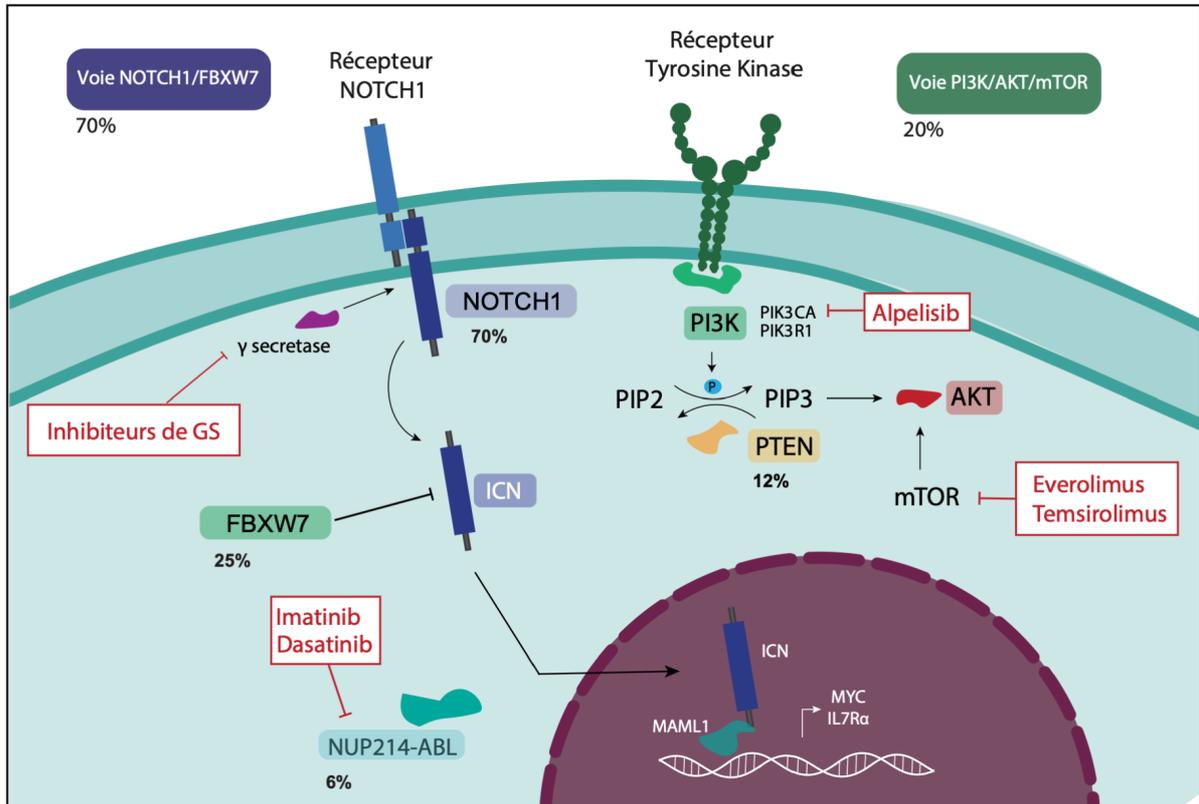


Figure 4. Altérations de la voie NOTCH1 et PI3K/AKT dans les LAL-T

Les mutations activatrices de *NOTCH1* et la perte de fonction de son E3-ligase régulatrice, *FBXW7*, conduisent à une activation constitutive de la voie NOTCH1 dans près des 2/3 des LAL-T. La dérégulation de la voie PI3K/AKT/mTOR est fréquente dans les LAL-T. On décrit des mutations activatrices du récepteur PI3K (*PIK3CA*, *PIK3R1*), des mutations activatrice d'*AKT1* mais surtout des pertes de fonction du régulateur négatif *PTEN* (délétion et/ou mutation). Les réarrangements *NUP214-ABL1* sont rares dans les LAL-T (6%) mais sont des cibles d'inhibiteurs de tyrosine kinase (Imatinib et Dasatinib). (Simonin and Asnafi, 2021).

5. De l'identification des altérations moléculaires récurrentes dans les LAL-T au perfectionnement de la stratification thérapeutique et la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Contrairement aux LAL-B qui bénéficient d'une stratification thérapeutique précise reposant sur l'identification d'altérations récurrentes (principalement de natures cytogénétiques) permettant un classement en sous-groupes de risques hiérarchisés, les LAL-T, notamment en raison de leur grande hétérogénéité mais aussi en raison de la nature même des altérations qui diffèrent par leur nature de celles observées dans les formes B (principalement de type mutationnel et/ou épigénétique) n'ont pu prétendre disposer, jusqu'à encore récemment, d'une classification thérapeutique spécifique.

La première proposition d'une stratification thérapeutique dans les LAL-T a été réalisée en 2013 à partir des résultats des protocoles GRAALL03/05 qui avait conduit à la mise en évidence d'un "classifieur" oncogénétique reposant sur l'existence d'un groupe de patients à faible

risque définit par la présence de mutations *NOTCH1* et/ou *FBXW7* sans altérations de *RAS* et *PTEN* (Trinquand et al., 2013a). La valeur pronostique de ce classifieur a d'ailleurs été récemment rapporté dans la population pédiatrique (protocole FRALLE2000T) (Petit et al., 2018). Certaines limites associées à ce « classifieur » doivent être précisées. D'une part sa valeur pronostique n'est pas retrouvée dans l'ensemble des protocoles internationaux, mettant en lumière l'interconnexion complexe qui existe entre les modalités des traitements et le statut mutationnel des LAL-T. D'autre part, ce « classifieur » est particulièrement pertinent dans l'identification des patients associés à un pronostic favorable mais ne parvient pas à prédire le groupe de patients, notamment chez l'enfant, à très haut risque de rechute qui devraient bénéficier d'une intensification thérapeutique et/ou de thérapies innovantes d'emblée.

Ce travail va démontrer comme le développement des techniques de séquençage à haut débit a permis la mise en évidence de nouvelles altérations associées à un risque majoré de rechute (*IKZF1*, *IDH2*, *TP53*...) pouvant conduire à une actualisation du précédent « classifieur » *NFRP* permettant ainsi d'affiner plus encore la stratification thérapeutique au diagnostic et cibler, à terme, les patients éligibles à une intensification thérapeutique et/ou à des thérapies innovantes en première ligne.

III. Rôle de la voie Notch1 dans l'oncogenèse T

1. Découverte de la voie de signalisation Notch

Au début du XX^{ème} siècle T.H Morgan fut le premier à décrire une souche de *Drosophile* présentant une mutation dont le phénotype se caractérisait par la présence d'une encoche (« *Notch* » en anglais) sur les ailes des drosophiles (Morgan, 1917). Ce n'est que 70 ans plus tard que le gène responsable de cette malformation fut identifié (Wharton et al., 1985) (Figure 5) et ce gène hérita du nom de *NOTCH1* en raison du phénotype spécifique associé à sa mutation.

La voie de signalisation de Notch1 est une des voies clés au cours du développement des organismes multicellulaires, on la retrouve ainsi impliquée dans le contrôle du destin cellulaire au sens large via la régulation de la croissance cellulaire, de la différenciation, de la survie et de l'organisation spatiale inter-cellulaire (Zhou et al., 2022).

La première description du potentiel rôle oncogénique de NOTCH1 chez l'humain fut identifiée chez un patient atteint d'une LAL-T au début des années 90. Ce patient présentait une

translocation t(7;9)(q34;q34.3) (Ellisen et al., 1991) responsable d'une réorganisation du gène NOTCH1 avec l'insertion d'une séquence promotrice du TCR β en amont de l'exon 24 de NOTCH1 responsable d'une surexpression d'une forme tronquée de NOTCH1, ce-dernier conservant son domaine intracellulaire nécessaire à l'induction de la cascade d'activation de la voie NOTCH. Le rôle central de NOTCH1 au cours de la thymopoïèse fut lui découvert presque 10 ans plus tard (Radtke et al., 2004).

En raison de ses multiples rôles, on comprend que les dérégulations de NOTCH1 sont impliquées dans un grand nombre de pathologies humaines, à la fois dans le champ oncologique mais également dans le cadre des pathologies développementales (Zhou et al., 2022).

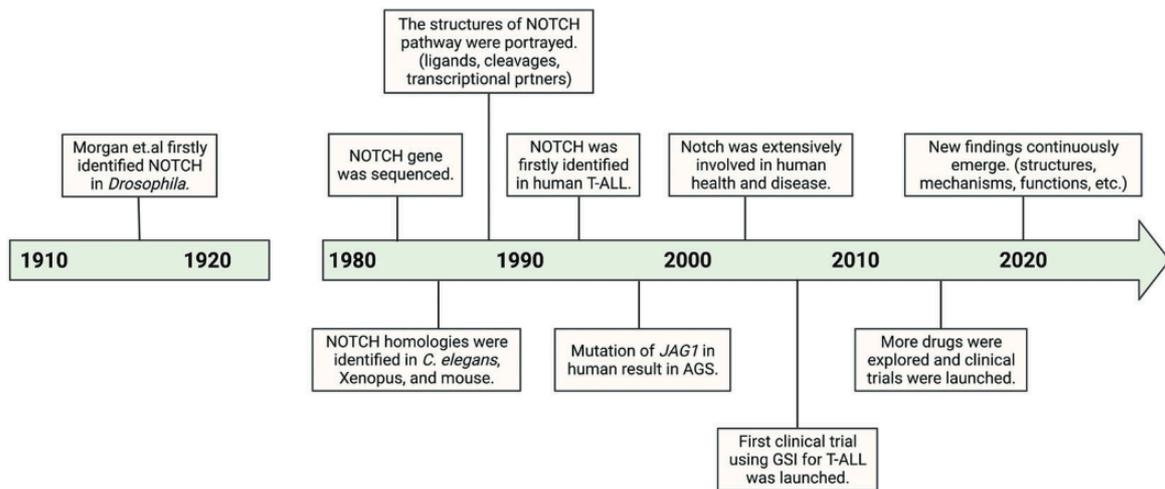


Figure 5 Historique de découverte de la voie Notch1 (Zhou et al., 2022)

T-ALL : T-cell acute lymphoblastic leukemia, AGSS : Alagille Syndrome, GSI : γ -secretase inhibitor

2. Mécanismes impliqués dans la signalisation de la voie Notch1

La voie de signalisation de Notch1 est complexe qui fait intervenir un très grand nombre de molécules différentes et ce de façon coordonnée (Figure 6).

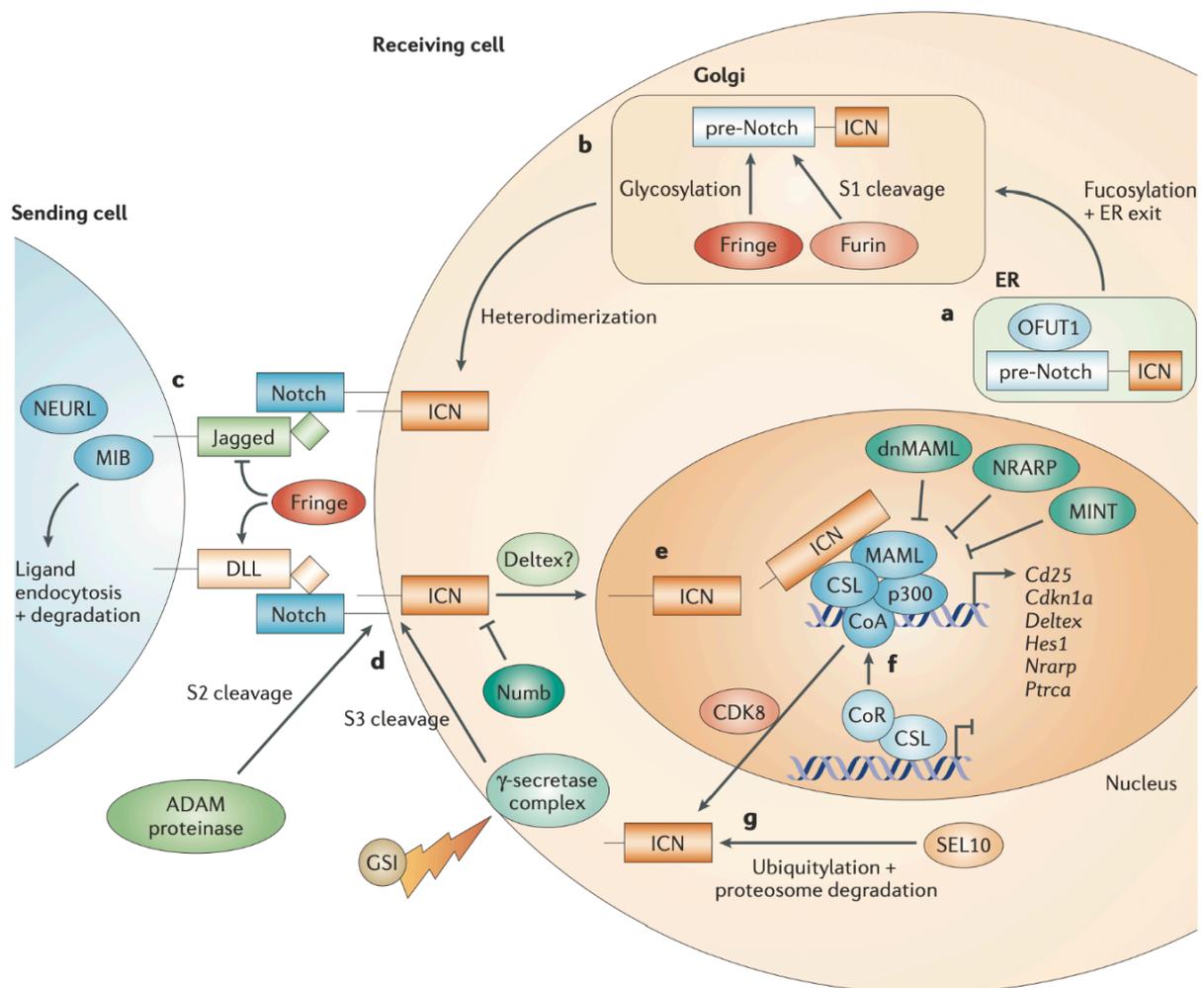


Figure 6. Représentation schématique de la voie de signalisation Notch1

(a) Les domaines intra et extra cellulaires de Notch1 sont synthétisés sous la forme d'une protéine unique (pré-Notch). La protéine OFUT1 (O-fucosyltransferase1) fonctionne comme une protéine chaperonne qui va permettre le transport de la molécule pré-Notch du réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi. (b) Le 1^o clivage de Notch a lieu dans l'appareil de Golgi (S1) et conduit à séparer Notch en deux parties extra et intra cellulaires qui forment un hétérodimère associé par des liaisons non covalentes qui va être transporté à la membrane plasmique. (d) L'interaction entre le récepteur Notch et son ligand va initier deux clivages successifs (S2 et S3). Le 1^o des 2 clivage est médié par une métalloprotéase (ADAM) et survient au niveau du domaine extra-cellulaire, ce clivage conduit au 3^o clivage réalisé par une γ sécrétase (S3) qui a lieu au niveau du domaine transmembranaire, celui-ci va conduire à la libération du domaine intracellulaire de Notch1 (ICN1). (e) ICN1 va ensuite transloquer dans le noyau où il interagit avec un grand nombre de co-facteurs aboutissant à générer le complexe d'activation de la voie Notch (CSL, MAML, p300) conduisant à la régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes cibles (*HES1*, *DELTEX*, *PTCRA*...) (g) La demi-vie de l'ICN1 est contrôlée par son domaine PEST. Après fixation à MAML et p300, ce domaine est hyperphosphorylé par CDK8, la phosphorylation du domaine PEST va faciliter son ubiquitinylation ultérieure par une E3 ligase (FBXW7) et conduire à son adressage au protéasome pour dégradation. (Source : Grabher et al. 2006)

Notch1 est synthétisé dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'une protéine unique (pré-Notch) qui est transportée par le réseau de l'appareil de Golgi. Au cours de cette étape la protéine Notch va subir de nombreuses modifications post-traductionnelles. Parmi ces modifications l'une d'entre elle correspond au premier des trois clivages de la protéine (S1) qui sépare les portions intra et extracellulaire de la protéine. Après le clivage S1 le récepteur Notch

est transporté à la membrane plasmique sous forme d'un hétérodimère. La liaison du récepteur de Notch avec son ligand s'accompagne dans un premier temps d'une modification conformationnelle du domaine HD (*heterodimerization domain*) permettant sa reconnaissance par une protéase de la famille des *ADAM* protéase. Ce second clivage (S2) s'accompagne ensuite d'un troisième clivage (S3) médié par une γ sécrétase aboutissant *in fine* au relargage de la portion intracellulaire de Notch1 ou ICN1 (*Intra-Cellular Notch1*).

ICN1 est un facteur de transcription qui régule de nombreux processus physiologiques cellulaires et notamment ceux impliqués dans les mécanismes de prolifération et différenciation via l'activation d'un grand nombre de gènes cibles notamment *cMYC*, *HES1* et le gène codant pour le pré-TCR ; *PTCRA* (Grabher et al., 2006; Palomero et al., 2006; Weng et al., 2006). ICN1 présente également de nombreuses interactions protéine-protéine régissant ainsi de nombreux et complexes nœuds de régulations de processus physiologiques intra-cellulaires (Figure 7) (Yatim et al., 2012). La régulation négative de NOTCH1 passe par un adressage au protéasome après ubiquitinylation réalisée au niveau du site C-terminal de Notch1 par des E3 ligases spécifiques (notamment l'E3 ligase FBXW7).

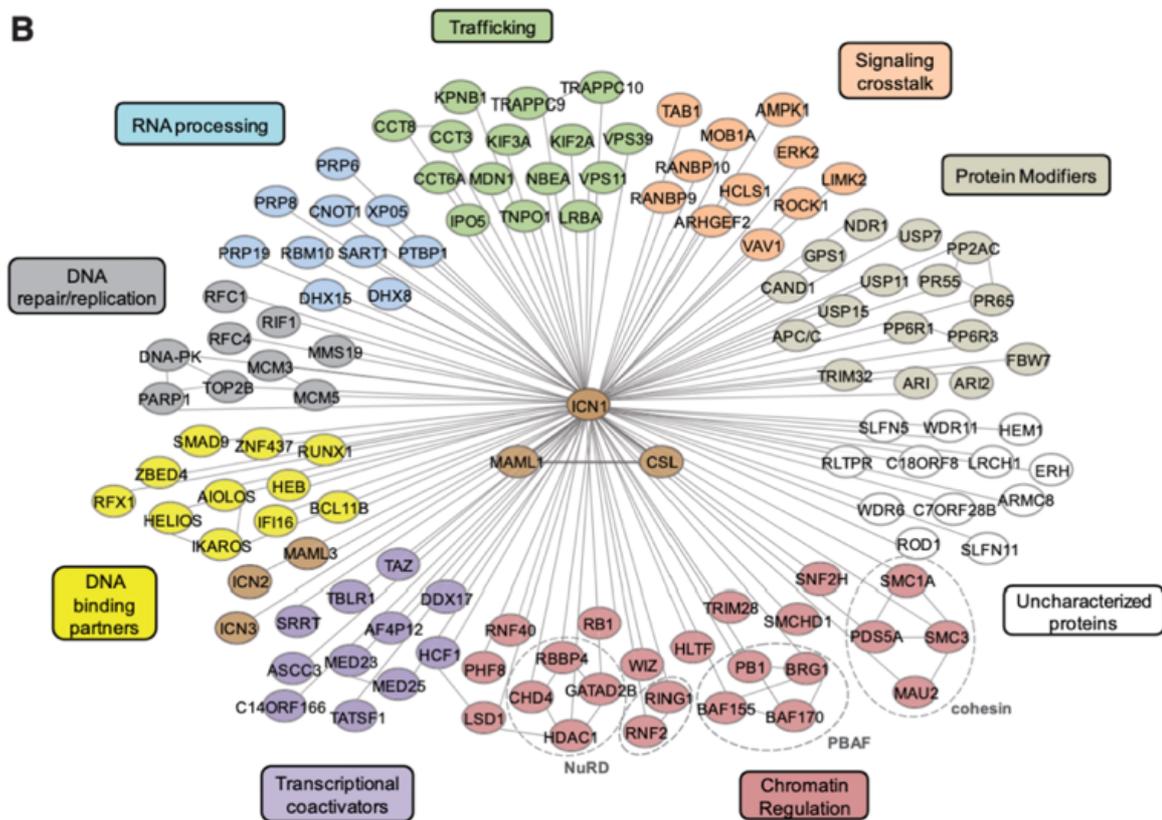


Figure 7 Interactome de Notch1

Représentation schématique des interactions entre Notch1 et ses partenaires identifiés en spectrométrie de masse (Yatim et al., 2012)

3. Rôle de Notch1 au cours la thymopoïèse :

La signalisation Notch1 est crucial pour l'engagement dans la lignée T des précurseurs hématopoïétiques (Figure 8). Au cours des phases précoces de la thymopoïèse, l'activation de Notch1 induit un engagement des précurseurs T dans le thymus et régule positivement leur prolifération, leur différenciation et la survie des progéniteurs T (Sambandam et al., 2005).

De façon notable, l'inactivation de la voie Notch1 dans les précurseurs hématopoïétiques ou lymphoïdes conduit à l'émergence d'une lymphopoïèse exclusivement constituée de lymphocytes B, confirmant le rôle central de la voie Notch1 au cours de la thymopoïèse (Wilson et al., 2001). Inversement, une activation constitutive de la voie Notch1 au cours de la lymphopoïèse inhibe la lymphopoïèse B et s'accompagne d'un développement extra-thymique de cellules T (Schmitt and Zúñiga-Pflücker, 2002). Au cours des réarrangements des gènes du TCR les cellules T subissent un engagement supplémentaire selon l'orientation vers la lignée

$\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Le rôle de Notch1 au cours de cette phase d'engagement est double, ainsi l'engagement dans la lignée $\gamma\delta$ pourrait être favorisée par l'activation de Notch1 au cours d'une étroite fenêtre temporelle développementale dans la population des thymocytes les plus immatures, alors que l'inactivation de Notch1 au cours des stades plus tardifs de la thymopoïèse (stade DN3) est responsable d'un blocage du développement $\alpha\beta$ (Ciofani et al., 2004; Wolfer et al., 2002). Le rôle exact de Notch1 au cours de l'engagement $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$ est toujours débattu et pourrait être dépendant du type de ligand associé au récepteur Notch1 ainsi qu'au stade de maturation.

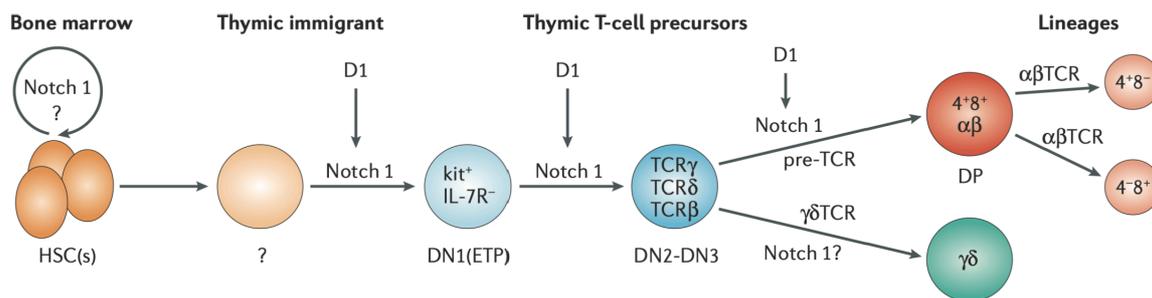


Figure 8. Rôle de Notch1 au cours de la thymopoïèse.

La voie de signalisation de Notch1 est impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et joue un rôle central dans l'engagement de ces CSH dans la lignée T. L'interaction entre Notch1 et ses ligands au niveau de la niche hématopoïétique influence les capacités d'auto-renouvellement des CSH. Par la suite, l'activation de Notch1 est nécessaire en vue de l'engagement d'une partie des cellules doubles négatives (DN1) en progéniteurs thymiques précoces (*ETP*, *early thymocytes progenitors*) puis au cours du processus de maturation T afin d'obtenir des thymocytes doubles positifs (DP). En revanche, l'orientation CD4 vs CD8 ne semble pas dépendant de l'activation de la voie Notch1. En plus des interactions entre Delta-like 1 (DLL1) ou DLL4 et Notch1, la différenciation des précurseurs DN en DP nécessite également l'activation de la voie du TCR (ou du pré-TCR) (*Grabher et al., 2006*).

4. Activation de Notch1 dans les LAL-T

L'activation dérégulée de la voie Notch1 dans les LAL-T a été initialement décrite dans une forme rare de LAL-T présentant une $t(7;9)(q34;q34.3)$ (Ellisen et al., 1991), responsable d'une expression aberrante d'une forme tronquée de Notch1 (TAN-1) qui se retrouve sous la dépendance de l'expression du locus du TCR β . Dépourvue son domaine extra-cellulaire au cours de la translocation, cette forme tronquée de Notch1 présente une activation indépendante de la liaison au ligand extracellulaire de Notch1 expliquant ainsi son expression dérégulée.

Cependant, l'activation de la voie Notch1 dans les LAL-T liée à cette $t(7;9)(q34;q34.3)$ est rare et ne reflète pas l'importance de la dérégulation de la voie Notch1 dans les LAL-T. En effet, l'activation de la voie Notch1 est principalement liée à la présence de mutations activatrices affectant différents domaines de la protéine, mais également de mutations

inactivatrices affectant son ubiquitine ligase (FBXW7) qui conduit également à une activation de la voie Notch1.

Ainsi, en 2004, Weng et al. ont identifié la présence de mutations affectant *NOTCH1* dans plus de 50% des LAL-T (Weng et al., 2004). Cette étude a conduit à mettre l'activation de Notch1 au centre de l'oncogenèse T et a été enrichie par la suite de nombreux travaux ayant permis de préciser la localisation et le type de mutation affectant *NOTCH1*. Par l'intermédiaire de mécanismes différents, ces mutations sont responsables *in fine* d'une activation dérégulée de la voie Notch1.

De façon notable, les mutations affectant *NOTCH1* n'ont pas une répartition spatiale stochastique. Ainsi deux domaines sont spécifiquement concernés par l'acquisition de mutations ponctuelles responsables à terme d'une activation constitutive de cette voie de signalisation (on parle de *Hotspot* mutationnels de *NOTCH1*).

Les mutations les plus fréquemment rencontrées concernent le domaine HD (*Heterodimerization Domain*) de Notch1 (25% des LAL-T). Ces mutations sont responsables d'une modification structurelle du **domaine HD**. Ce domaine constitue la région de reconnaissance de Notch1 par les métalloprotéases puis par les γ sécrétases. En cas de mutations affectant le domaine HD, les modifications structurelles de ce domaine qui en découlent vont conduire à une activation successive des métalloprotéases puis des γ sécrétases conduisant au relargage de la portion active de Notch1 (ICN1). Ce phénomène se produit en l'absence de liaison du domaine EGFR de Notch1 avec son ligand. On parle ainsi d'activation de Notch1 *ligand-indépendante*.

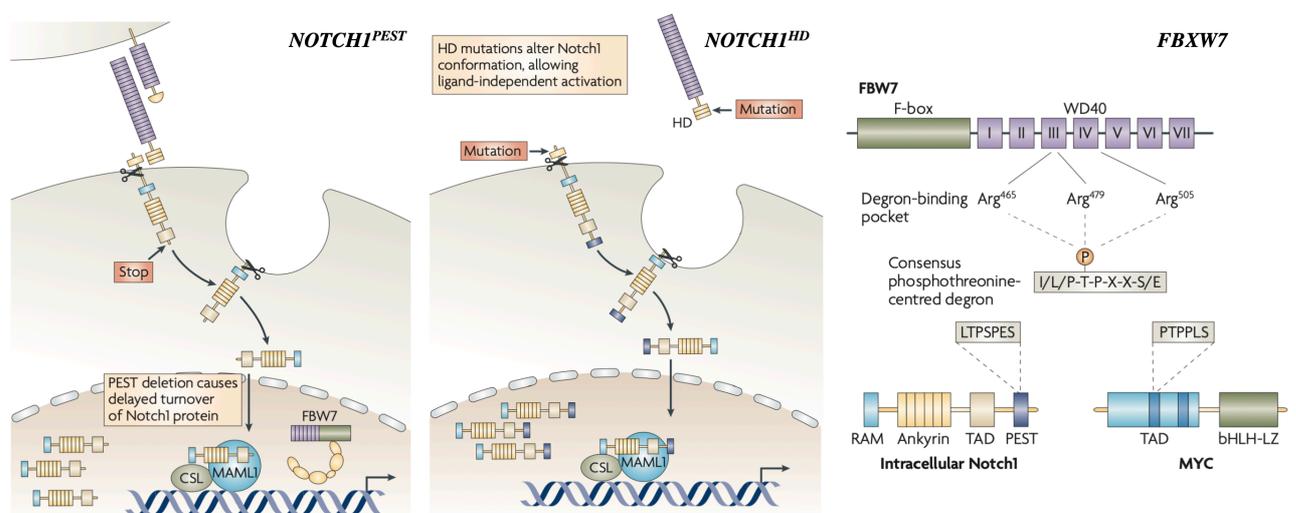


Figure 9 Les différentes mutations responsables d'une activation de la voie Notch1 dans les LAL-T.

Les mutations du domaine PEST de Notch1 (a) conduisent à une stabilisation de la portion intracellulaire de Notch1 (ICN1) en perturbant l'interaction entre Notch1 et son E3 ligase FBXW7. (b) les mutations du domaine HD sont responsables d'une augmentation de la sensibilité de Notch1 à l'activité des métalloprotéases qui entraînent un relargage de la portion intracellulaire active de Notch1, ICN1. Ce clivage en présence de mutations HD devient indépendant de toute interaction entre Notch1 et son ligand, induisant une activation constitutive et non régulée de Notch1. (c) Enfin, les mutations inactivatrices affectant l'E3 ligase de Notch1, FBXW7, sont également associées à une dérégulation de la voie Notch1 puisqu'elle augmentent de façon significative la demi-vie de l'ICN1.

A l'inverse, les mutations affectant le domaine C-terminal de Notch1 (15% des LAL-T) vont conduire à une modification structurelle du **domaine PEST** (séquence peptidique riche en proline (P), acide glutamique (E), serine (S), et thréonine (T)). Ce domaine est la cible des protéines de type ubiquitine-ligases (E3 ligases) dont le rôle est d'adresser Notch1 vers le protéasome afin d'y être dégradé. En cas de mutation ayant pour conséquence fonctionnelle une délétion de cette région PEST (principalement des mutations non-sens ou mutations avec décalage du cadre de lecture responsable de l'apparition d'un codon stop précoce), Notch1 ne sera plus soumis au contrôle négatif assuré par ces E3 ligases et verra donc sa demi-vie augmentée de façon significative avec pour conséquence une activation dérégulée de cette voie.

On comprend également qu'une perte de fonction affectant les E3 ligases participant à la dégradation de la protéine Notch1 puisse conduire au même type de conséquence fonctionnelle. C'est effectivement ce qu'on observe avec les mutations pertes de fonction affectant **FBXW7** (*F-Box And WD Repeat Domain Containing 7*) l'E3 ligase principale de Notch1. Ainsi, entre 10 et 20% des LAL-T présente des mutations de *FBXW7*. *FBXW7* reconnaît les motifs phosphorylés situés dans le domaine PEST de NOTCH1 et réalise leur ubiquitination conduisant à la dégradation protéosomale de NOTCH1.

Ces mutations activatrices de la voie Notch1 peuvent être associées. La redondance fonctionnelle entre les mutations *NOTCH1-PEST* et celle affectant l'E3 ligase de Notch1 *FBXW7* expliquent que cette association soit la moins fréquente, alors que l'association NOTCH1-HD + NOTCH1-PEST ou NOTCH1-HD + FBXW7 sont fréquemment retrouvées (Figure 10) et auraient un effet additif sur l'activation de la voie NOTCH1.

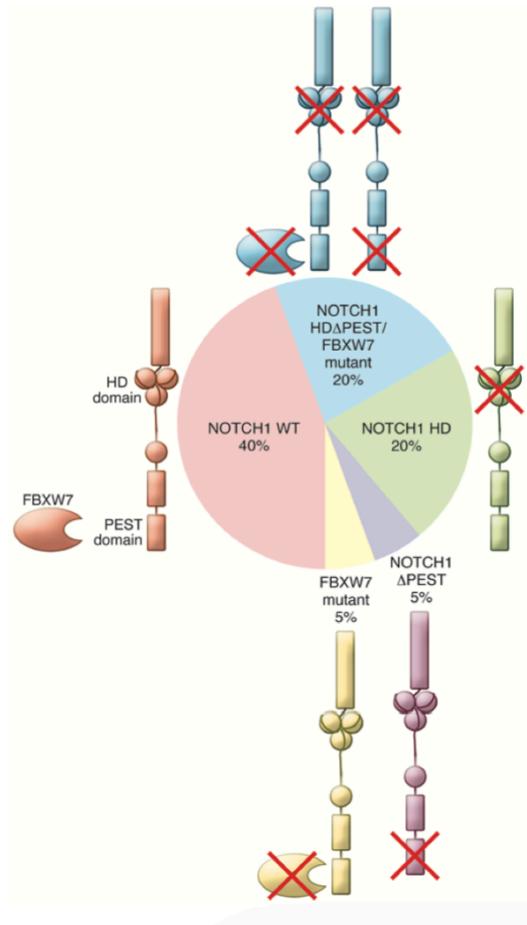


Figure 10 Prévalence des mécanismes conduisant à une activation constitutive de la voie Notch1 dans les LAL-T

Représentation schématique des différentes mutations de *NOTCH1* dans les LAL-T. A noter que les associations de mutations activatrices NOTCH1-HD et inactivatrices de FBXW7 sont fréquentes (environ 20% des LAL-T). Alors que les mutations isolées de *FBXW7* et de *NOTCH1-PEST* sont plus rares (5% des LAL-T environ) (Van Vlierberghe and Ferrando, 2012).

5. Distribution des mutations de *NOTCH1* selon l'oncogénétique et le phénotype des LAL-T

L'analyse du paysage mutationnel des LAL-T a permis de mettre en évidence certaines spécificités dans la distribution des mutations de *NOTCH1* dans les LAL-T.

Les LAL-T de type *ETP* ont une fréquence plus faible de mutation de *NOTCH1* et parmi les LAL-T corticales cette fréquence est plus élevée au sein du contingent *TLX1/TLX3* alors qu'elle diminue dans les stades les plus matures qui se caractérisent par un profil *SIL-TAL1* (Figure 11).

Cette distribution non aléatoire des mutations de *NOTCH1* peut s'expliquer par le rôle de la voie Notch1 au cours de la thymopoïèse, ainsi il est admis que la signalisation de Notch1 augmente au cours du développement des thymocytes atteignant un pic au moment de la transition DN et DP puis s'éteint dans les phases de développement plus mature.

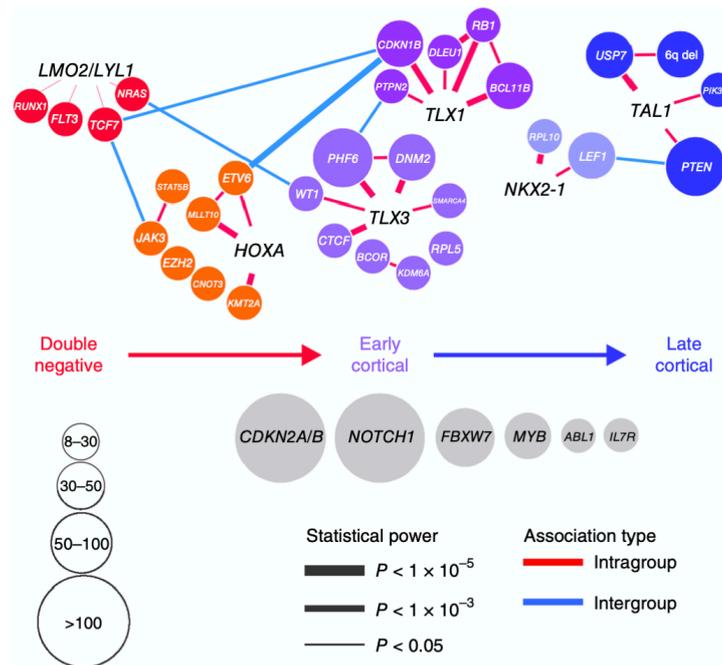


Figure 11 Distribution préférentielle des altérations selon l'oncogénétique dans les LAL-T

Schéma en réseau représentant les associations entre les différentes altérations oncogéniques selon les sous-groupes de LAL-T et les différents stades du développement T. La taille de chaque cercle représente la fréquence des altérations selon le groupe de LAL-T. L'épaisseur des liaisons représente la significativité du test d'association entre l'altération observée et sa présence dans chaque sous-groupes spécifiques (Y. Liu et al., 2017).

6. Conséquences fonctionnelles de l'activation de la voie NOTCH1.

D'un point de vue mécanistique, les mutations de *NOTCH1* dans les LAL-T détournent le rôle physiologique de la signalisation NOTCH qui favorise l'engagement de la lignée des cellules T, la croissance cellulaire et la prolifération pendant le développement des thymocytes.

L'exploration transcriptomique des lignées de LAL-T présentant des mutations de *NOTCH1* avant et après blocage de la voie de la signalisation de Notch1 par l'utilisation d'inhibiteurs de γ sécrétase (GSI, *γ Secretase Inhibitor*) couplée avec une analyse des sites de fixation de NOTCH1 ont permis de souligner le rôle majeur de Notch1 dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation positive des voies métaboliques anaboliques, la biosynthèse des acides aminées et des nucléotides ainsi que dans la biogénèse ribosomale et la synthèse protéique. (Palomero et al., 2006). De façon notable, en situation d'inhibition de la voie Notch1, la régulation négative de la signature métabolique de Notch1 s'accompagnait également d'une diminution de la croissance et de la prolifération cellulaire avec un arrêt des cellules en phase G1 et une diminution de la taille de ces cellules (Palomero et al., 2006).

En outre, les analyses phénotypiques et métabolomiques des tumeurs dépendantes de NOTCH1 ont montré que l'abrogation de la signalisation oncogène de NOTCH1 induit une crise métabolique qui, outre la régulation transcriptionnelle liée à la baisse des gènes anaboliques, comprend une régulation positive des voies cataboliques (protéasome, ubiquitination et autophagie), une diminution des flux glycolytiques et glutaminolytiques et une majoration de l'autophagie. (Herranz et al., 2015).

L'autophagie est donc un mécanisme qui favorise la survie des cellules leucémiques dans un contexte où NOTCH1 est inhibé en fournissant une source alternative de précurseurs indispensables au renouvellement et à la biosynthèse des composants intracellulaires comme en témoigne la synergie observée en cas de co-inhibition de la voie Notch1 et des mécanismes d'autophagies. De plus, les LAL-T dépendantes de la voie Notch1 semblent particulièrement dépendantes de la glutaminolyse pour leur croissance cellulaire, et l'inhibition de cette dernière augmente fortement l'effet anti tumoral des inhibiteurs de Notch1 (Nguyen et al., 2021).

Au-delà de l'impact de Notch1 sur le métabolisme cellulaire, HES1 (un facteur de transcription directement régulé par Notch1) joue un rôle important au cours de la thymopoïèse et constitue un élément central en tant qu'effecteur majeur de la voie Notch1 (Wendorff et al., 2010). D'autres cibles majeures de Notch1 impliquées dans la thymopoïèse mais également dans le développement leucémique ont été rapportées, notamment NOTCH1 lui-même (Yashiro-Ohtani et al., 2009), IL7RA (González-García et al., 2009) pré-TCRA (Reizis and Leder, 2002) IGF1R, (Medyouf et al., 2011) et LUNAR (ARN non codant) (Trimarchi et al., 2014).

Il est crucial de noter que les mutations activatrices de NOTCH1 fonctionnent de concert avec de nombreuses autres altérations génétiques participant au processus d'oncogenèse dans les LAL-T.

L'oncogène *TALI* par exemple, fréquemment associés aux oncoprotéines LM01 et LM02, est exprimé de façon aberrante dans les LAL-T en raison de translocations chromosomique ou en cas de délétions focales et plus rarement de mutations. L'analyse des modèles transgéniques de LAL-T induites par *TALI-LM01* ont permis de comprendre les mécanismes régissant l'interconnexion entre ces différents oncogènes (Gerby et al., 2014; Göthert et al., 2007). L'activation de *TALI* dans les thymocytes aux stades précoces de leur développement est corrélée avec une augmentation de l'expression de NOTCH1 et en conséquence une régulation positive de l'expression des gènes cibles de NOTCH1 (Gerby et al., 2014). L'expression transgénique de *TALI-LMO1* est responsable d'une reprogrammation des thymocytes au stade DN3 qui entrent dans un processus d'auto-renouvellement assimilable

un stade pré-leucémique., dont la réversibilité était obtenue après inhibition de la voie NOTCH1. (Göthert et al., 2007). De plus, la surexpression de NOTCH1 dans ce modèle conduisait à une augmentation de l'auto-renouvellement et des possibilité de transplantation successives des progéniteurs *TALI-LMO1*, en raison d'une augmentation du pool de thymocytes possédant des capacités d'auto renouvellement, initialement limité au DN3 mais étendue à l'ensemble des population DN et ISP dans ce modèle (Gerby et al., 2014).

Prise en charge et stratification des LAL

I. Prise en charge thérapeutique actuelle des LAL

1. Généralités sur la prise en charge des LAL

Le pronostic des LAL a connu un bouleversement majeur au cours des 50 dernières années. Alors que la survie globale n'était que de 10 à 15% dans les années 60, celle-ci se situe actuellement aux alentours de 80-90% (Hunger and Mullighan, 2015). De nombreux facteurs permettent d'expliquer cet accroissement de la survie (figure 4) au premier rang desquels les bénéfices apportés par la collaboration des différents groupes internationaux, qui au grès des nombreux protocoles thérapeutiques successifs ont permis de toujours mieux adapter le traitement des LAL, à la fois dans l'optique d'améliorer la survie des patients tout en œuvrant à réduire les séquelles post-thérapeutiques.

2. Facteurs pronostiques historiques dans les LAL

Afin de proposer aux patients un traitement d'intensité adapté à la sévérité de la leucémie, il est fondamental de déterminer le groupe de risque de chaque patient (risque de rechute et/ou de décès). La distinction de ces groupes était auparavant fondée sur des facteurs pronostiques cliniques : l'âge au diagnostic, la leucocytose initiale et l'envahissement du système nerveux central. Le perfectionnement des techniques de cytogénétique et plus récemment de biologie moléculaire ont permis d'affiner cette stratification qui repose actuellement sur de nombreux critères (Tableau 1).

a) Facteurs liés à la présentation clinique

La caractérisation très précise des sous-groupes génétiques n'a pas effacé l'impact pronostique des caractéristiques cliniques du diagnostic. Ainsi, dans les LAL-B, un âge supérieur à 10 ans (ou inférieur à un an) et/ou un taux de globules blancs supérieur à 50.000/mm³ sont considérés comme des facteurs de stratification thérapeutique au diagnostic.

Historiquement ces deux seuils ont été fixés pour distinguer les LAL-B de risque standard (NCI-SR) des autres (NCI-HR) en sachant qu'environ 2/3 des patients se situe dans la 1^{ère} catégorie (Smith et al., 1996). Les nourrissons de moins d'un an sont d'emblée considérés comme à haut risque et sont traités dans des protocoles spécifiques adaptés à leur âge mais également à leur risque cytogénétique particulier.

L'âge et le taux de GB ont en revanche un impact pronostique plus limitée dans les formes T et ne sont pas stratifiant à ce jour bien qu'un taux de globules blancs supérieur à 200.000/mm³ semble prédictif de rechute dans ce sous-type de LAL(Wood et al., 2014). Les facteurs pronostiques spécifiques aux LAL-T seront abordés plus spécifiquement par la suite.

Les atteintes neurologique ou testiculaire constituent également des facteurs de risque au diagnostic dans les LAL B et T. D'autres facteurs cliniques autrefois associés à un mauvais pronostic ont vu leur effet défavorable « s'effacer » avec le perfectionnement des protocoles de chimiothérapies, c'est notamment le cas des formes de LAL avec une présentation « lymphomateuse » au diagnostic.

b) Facteurs liés à la caractérisation biologique et génétique

Les altérations génétiques initiatrices ont un impact fort sur le pronostic des patients atteints de LAL. Leur proportion varie avec l'âge expliquant en partie l'aggravation du pronostic chez les enfants plus âgés chez qui les sous-groupes de bon pronostic sont quantitativement moins fréquents. Ainsi, au sein des LAL-B, les anomalies génétiques associées à un bon pronostic (hyperdiploïdie et translocation *ETV6-RUNX1*) représentent chez l'enfant 50% des NCI-SR, 25% des NCI-HR et seulement 8% des adolescents et jeunes adultes (Figure 12et Figure 13) (Iacobucci and Mullighan, 2017; Moorman, 2016).

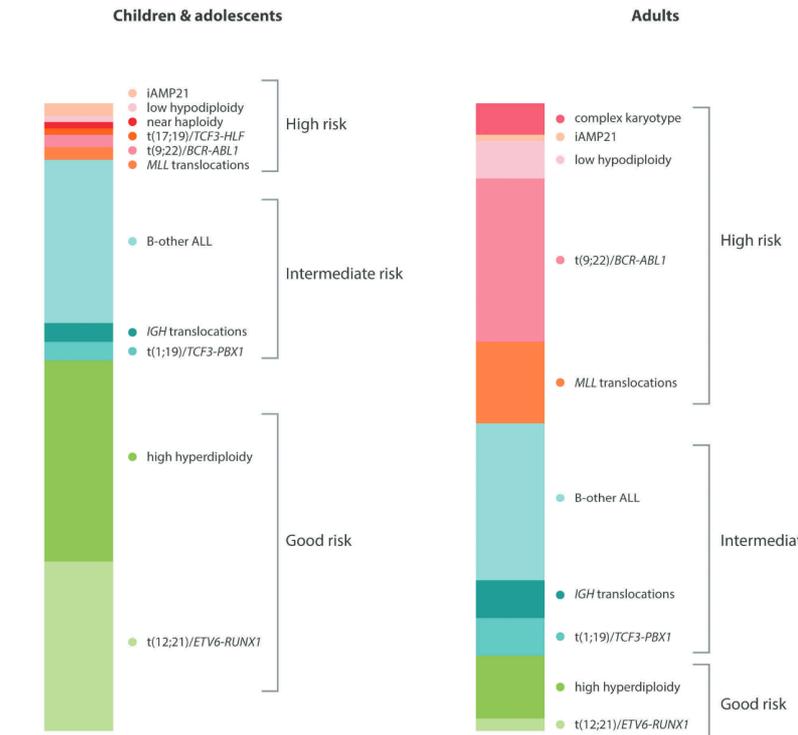


Figure 12 Fréquence des altérations chromosomiques observées dans les LAL-B adultes et pédiatriques (Moorman, 2016).

	Patients with B-cell ALL	Patients with T-cell ALL
Clinical		
Favourable	Age 1–10 years and leucocyte count $<50 \times 10^9/L$, Caucasian or Asian, CNS1 disease status	CNS1 disease status
Intermediate	Age ≥ 10 years, leucocyte count $50\text{--}100 \times 10^9/L$, black race, CNS2 disease status, testicular leukaemia	CNS2 or CNS3 disease status, testicular leukaemia
Unfavourable	Age <1 year, leucocyte count $>100 \times 10^9/L$, native American or Hispanic race, CNS3 disease status	Leucocyte count $>200 \times 10^9/L^*$
Biological		
Favourable	ETV6–RUNX1-type, hyperdiploidy (51–67 chromosomes; DNA index ≥ 1.16)	NOTCH1 mutation, FBXW7 mutation
Intermediate	ETV6–RUNX1-like, TCF3–PBX1, DUX4–ERG, PAX5, ZNF384-rearranged, iAMP21	Early T-cell precursor ALL
Unfavourable	BCR–ABL1-type, BCR–ABL1-like, KMT2A-rearranged, MEF2D-rearranged, hypodiploid (<44 chromosomes)	RAS mutation, PTEN mutation, lack of biallelic TRG rearrangements
Response to chemotherapy (minimal residual disease)		
Favourable	Day 8 blood minimal residual disease $<10^{-4}$, day 15 or day 19 bone marrow minimal residual disease $<10^{-2}$, end of induction bone marrow minimal residual disease $<10^{-4}$	End of induction bone marrow minimal residual disease $<10^{-4}$
Intermediate	End of induction bone marrow minimal residual disease from 10^{-4} to 10^{-2}	End of induction bone marrow minimal residual disease $\geq 10^{-4}$ and end of consolidation minimal residual disease $\geq 10^{-4}$ and $<10^{-3}$
Unfavourable	End of induction bone marrow $>1\%$ blasts	End of consolidation bone marrow minimal residual disease $\geq 10^{-3}$
ALL=acute lymphoblastic leukaemia. *Not consistent.		
Table 3: Prognostic indicators for patients with B-cell ALL and T-cell ALL		

Figure 13 Facteurs pronostiques dans les LAL-B et T (Teachey et Pui 2019)

Certaines altérations génétiques secondaires ont également un rôle dans le pronostic des patients. Les délétions d'*IKZF1* sont détectées chez environ 15% des patients mais cette proportion peut monter jusqu'à 70% dans certains sous-groupes, comme dans les LAL *Ph1* et *Ph1-like* il a été démontré que leur présence grevait fortement le pronostic des patients, même chez ceux appartenant à un groupe de bon pronostic, à l'exception notable du groupe *DUX4/ERG*. L'impact des autres délétions telles que *BTG1*, *PAX5*, *CDKN2A/CDKN2B*, *PAR1* a été également exploré et l'analyse de l'impact clinique associé à ces altérations a conduit à les intégrer dans la classification des LAL-B dans le protocole pédiatrique ALLTogether (NCT03911128).

c) Facteurs liés à la réponse au traitement

Deux paramètres sont utilisés en pratique courante pour évaluer la réponse au traitement. Leurs modalités d'évaluation sont bien définies.

1. Corticosensibilité

La première évaluation est réalisée après une exposition à 7 jours de prednisone et une ponction lombaire de méthotrexate. La cortico-sensibilité ou -résistance est définie par la présence d'un nombre de blastes circulant respectivement inférieur ou supérieur à 1.000/mm³ au 8^{ème} jour du traitement. Les formes corticorésistantes représentent environ 10% des LAL B (Domenech et al., 2014) et jusqu'à 40% des LAL T (Petit et al., 2018) et sont associées à un pronostic plus défavorable ce qui justifie une intensification thérapeutique chez ces patients. L'impact de ce facteur tend néanmoins à s'effacer devant l'évaluation de la maladie résiduelle (MRD, *Minimal Residual Disease*). Il n'est aujourd'hui plus décisionnel dans certains protocoles.

2. Mesure de la maladie résiduelle ou MRD

Le délai nécessaire pour obtenir un taux de cellules leucémiques résiduelles indétectables est un des facteurs pronostiques majeurs dans les LAL de l'enfant. Ce délai de réponse est en réalité la conjugaison de nombreux facteurs indépendants mais potentiellement additifs tels que les caractéristiques cytogénétiques de la leucémie, le type et l'intensité du traitement reçu, ainsi que la pharmacocinétique et la pharmacodynamie propre à chaque patient (fonction de son âge et de ses polymorphismes génétiques hérités).

Les techniques de biologie moléculaire actuelles permettent de détecter la présence d'une cellule leucémique au sein de 10^5 cellules hématopoïétiques normales. Ces techniques de mesure de la maladie résiduelle (ou MRD pour *Minimal Residual Disease*) reposent sur la détection par PCR des réarrangements spécifiques du clone tumoral pour les gènes des immunoglobulines IGH ou TCR. La mesure de la MRD peut également se réaliser par cytométrie en flux (CMF) via la recherche de l'expression aberrante d'une combinaison de marqueurs définie au moment du diagnostic et permettant un suivi au cours du traitement.

Les études récentes retrouvent un risque de décès 3 à 5 fois supérieur parmi les enfants avec une mesure de la MRD positive par rapport aux enfants avec une MRD négative (Cavé et al., 1998; Schrappe et al., 2011). Ainsi, une MRD dont l'évolution ne serait pas satisfaisante peut justifier à elle seule une indication d'allogreffe chez des patients en première rémission. Si l'impact pronostique que représente ce marqueur est aujourd'hui admis internationalement il persiste en revanche des interrogations sur le meilleur moment pour interpréter la qualité de cette réponse en cours de traitement. Ce constat est particulièrement vrai pour les formes T où certaines études mettent en évidence une plus lente décroissance de la MRD au cours du traitement. Pour ces auteurs c'est la mesure de la MRD « tardive » (*cad* post-consolidation au lieu de post-induction) dans les formes T qui aurait un réel impact pronostique (Schrappe et al., 2011). Répondre à cette question centrale puisque source de modification thérapeutique majeure, est notamment un des enjeux des protocoles thérapeutiques actuels.

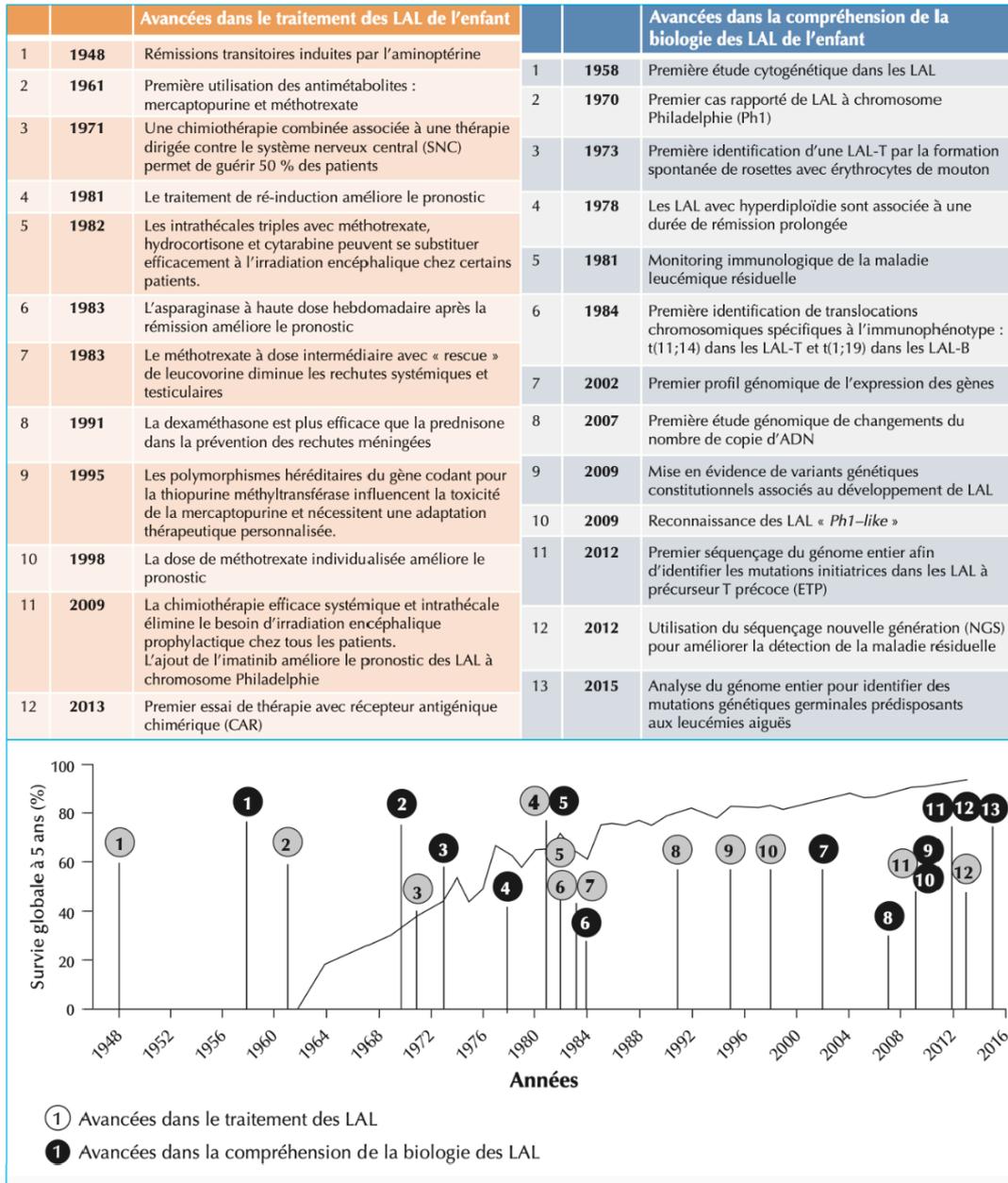


Figure 14 Mis en parallèle de l'évolution du pronostic des LAL au cours des 50 dernières années avec les différentes avancées réalisées dans le champ de la biologie.

Le pronostic des LAL a connu un bouleversement majeur au cours des 50 dernières années. Alors que la survie globale n'était que de 10 à 15% dans les années 60, celle-ci se situe actuellement aux alentours de 80-90% selon les derniers protocoles. L'essor de la biologie moléculaire dans le même temps a joué un rôle prépondérant dans l'amélioration de ce pronostic. (Simonin et al., 2019a)

3. Les principes du traitement des LAL

a) Les premiers succès thérapeutiques

Depuis la première description en 1948 par Sidney Farber (Farber and Diamond, 1948) des premières rémissions, transitoires, de LAL grâce à un traitement reposant sur un anti-

folates ; l'aminoptérine, des progrès thérapeutiques exceptionnels ont été réalisés depuis, notamment via l'émergence des schémas de polychimiothérapies au cours des années 60. Ces premières combinaisons ont permis d'obtenir des rémissions complètes dans près de 80 à 90% des cas (Pinkel, 1971). Cependant, ces enfants présentaient une rechute dans près de 75% des cas, à point de départ neuro-méningé, puis secondairement médullaire. L'addition de ponctions lombaires avec injections intrathécales de chimiothérapies et l'ajout d'une irradiation craniospinale dans le schéma protocolaire de traitement des LAL ont permis de faire chuter drastiquement le nombre de rechutes neuro-méningées et d'augmenter les taux de survie des LAL (Figure 14) (Heikamp and Pui, 2018).

Un autre tournant majeur dans le traitement des LAL a été l'introduction par le groupe Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) d'un schéma toujours utilisé aujourd'hui reposant sur l'utilisation de 8 médicaments pendant 8 semaines (induction puis consolidation) (Henze et al., 1981). Ce protocole constitue encore aujourd'hui la colonne vertébrale de la quasi-totalité des protocoles internationaux de traitement des LAL (adultes et pédiatriques).

1. Principes des protocoles actuels de chimiothérapie

Le schéma classique de traitement d'une LAL est aujourd'hui standardisé et la quasi-totalité des protocoles internationaux s'articulent autour de 4 à 5 phases successives pour une durée totale de traitement d'environ 2 ans (Figure 15) :

- L'induction (composée de 3 à 5 molécules) dont l'objectif est l'obtention de la rémission complète (RC) (définie par un examen clinique normal, la reprise d'une hématopoïèse normale attestée par une NFS normale et une blastose médullaire inférieure à 5% à J35-J42)
- La consolidation utilisant principalement des molécules non administrées en induction pendant environ 8 semaines
- L'intensification retardée pour laquelle est utilisée une polychimiothérapie reprenant notamment les molécules de l'induction et de la consolidation. Le bénéfice d'une intensification tardive (ou de 2 en cas de facteurs pronostiques péjoratifs) a été démontré, y compris pour les LAL de risque standard. Dans les LAL de risque intermédiaire ou de haut risque, respectivement une ou deux phases comportant des injections de méthotrexate à haute dose y sont associées.
- Enfin, le traitement d'entretien dont l'objectif est l'éradication d'éventuelles cellules blastiques résiduelles. Cette phase de traitement est principalement ambulatoire. Il associe

l'administration orale quotidienne de 6-mercaptopurine et hebdomadaire de méthotrexate pendant 18 à 24 mois. La première année, s'ajoutent éventuellement des réinductions mensuelles intraveineuses de vincristine associées à une corticothérapie de courte durée. La prophylaxie méningée par injections intrathécales trimestrielles se poursuit pendant cette phase.

La chimiothérapie systémique ne diffusant pas toujours suffisamment à travers la barrière hémato-méningée pour assurer une prophylaxie neuro-méningée efficace, des injections intrathécales de chimiothérapies sont assurées tout au long du traitement afin d'éviter les rechutes au niveau du système nerveux central. Son intensité sera fonction de l'atteinte initiale du système (SNC) et/ou du risque de rechute neuro-méningée estimée par différentes caractéristiques propres à la LAL. Pour les patients à très haut risque de rechute méningée, l'administration de perfusions de méthotrexate à haute dose peut être préconisée.

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques en 1ère rémission complète est réservée aux LAL de haut risque soit moins de 10% des enfants : ceux ayant des formes génétiques de très mauvais pronostic et surtout chez ceux ayant une décroissance non optimale de leur niveau de MRD (Fagioli et al., 2013).

Concernant les adolescents et les jeune adultes (15 et 39 ans) il est intéressant de noter que ces derniers bénéficient très clairement d'une approche type "pédiatrique" malgré les spécificités qu'ils présentent (plus grande incidence des formes *Phi(+)* ou *Phi-like* par rapport aux formes pédiatriques par exemple) (Boissel and Baruchel, 2018)..

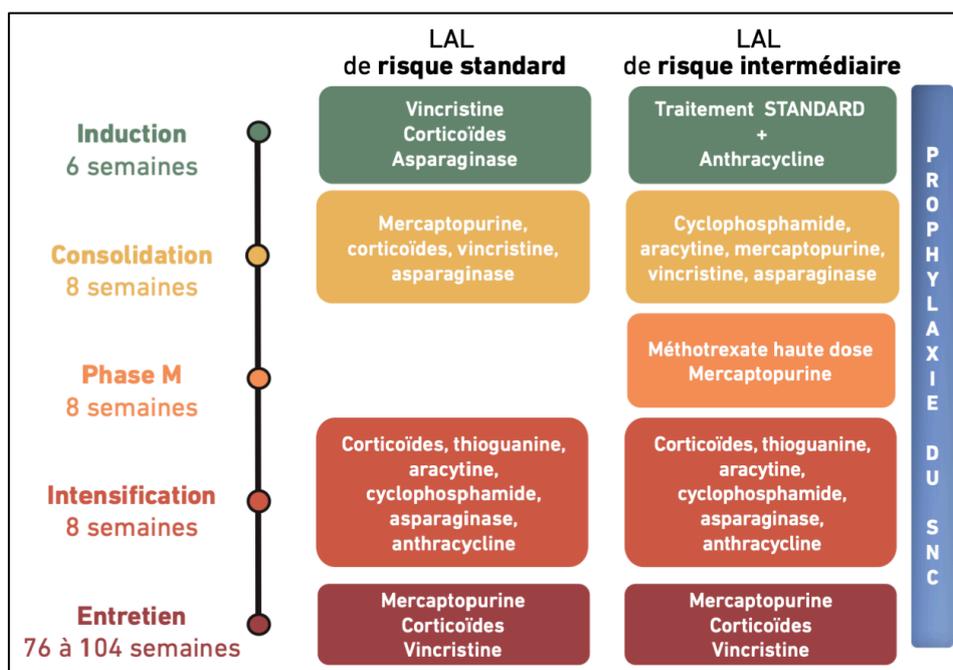


Figure 15 Les grands principes du traitement des LAL (Simonin et al., 2019b)

II. Les spécificités de la prise en charge thérapeutique des LAL-T

Alors que la polychimiothérapie demeure la pierre angulaire du traitement de première ligne des LAL-T de l'adulte et de l'enfant, le type de chimiothérapie et le pronostic associé diffèrent entre les 2 classes d'âge. Jusqu'à l'intégration de la Nelarabine en 1^o ligne dans certains protocoles thérapeutiques, les LAL-T et les LAL-B étaient traitées de façon similaire dans les précédents protocoles.

1. Prise en charge des LAL-T pédiatriques/adolescents-jeunes-adultes (AJA)

Au cours des dernières décennies le pronostic des enfants et des adolescents/jeunes adultes (AJA) atteints de LAL-T s'est amélioré de façon constante principalement en raison des modifications thérapeutiques progressives et l'adoption de protocoles inspirés de la pédiatrie pour les AJA (Figure 16) (Boissel et al., 2003; Stock et al., 2008).

No.	Name of Trial Years of Enrollment	No. of T-ALL Patients Age Range (y)	Steroid Used	Cranial Radiation	Novel Agent Used	DFS and OS in T-ALL Patients	Ref
1.	CALGB 10403 2007–2012	71 17–39 y	Pred *	Yes—in all T-ALL	None	3 y DFS 66% 3 y OS 73%	[7]
2.	COG AALL0434 2007–2014	1562 1–31 y	Pred	Yes—in IR and HR groups **	Nelarabine	5 y EFS 83% 5 y OS 89%	[80]
3.	COG AALL1231 2014–2017	847 1–30 y	Dex	Only in VHR † group	Bortezomib	3 y EFS 83% 3 y OS 86%	[104]
4.	NOPHO ALL2008 2008–2014	231 1–45 y	Dex	No	None	5 y EFS 74% 5 y OS 75%	[109]
5.	Total therapy XVI 2007–2017	104 0–18 y	Pred	No	None	5 y EFS 81% 5 y OS 87%	[103]

* Pred—prednisone, Dex—dexamethasone ** IR—intermediate risk, HR—high risk † VHR—very high risk: Day 29 M3 marrow, EOC MRD > 0.1%, CNS3.

Figure 16 Protocoles thérapeutiques récents dans les LAL-T pédiatriques (Shiraz et al., 2021)

1- L'intensification de l'induction et de la consolidation dans les LAL-T—Comme nous l'avons abordé précédemment, l'induction consiste en la réalisation d'une polychimiothérapie à base de 4 drogues contenant un stéroïde (dexaméthasone ou prednisone), une anthracycline, de la vincristine et de l'asparaginase suivie d'une consolidation type BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) intensifiée contenant du cyclophosphamide (Schrappe et al., 2000; Silverman et al., 2000; Vora et al., 2014).

2- Dexaméthasone (DEX) à la place de la prednisone (PRED) pendant l'induction. La DEX est un stéroïde plus puissant que la prednisone et présentant une meilleure diffusion dans le SNC associé à une diminution du taux de rechute globale mais également neuro-méningée (NM). Dans l'étude AIEOP-BFM ALL 2000 il existait un bénéfice statistiquement significatif en faveur de la DEX en termes de survie (Möricke et al., 2016). De façon comparable, dans les études britanniques UK MRC ALL97 et ALL97/99 la DEX était associée à une diminution du risque de rechute NM isolée et un gain en survie sans évènement (EFS, Event Free Survival) comparée à la PRED (Mitchell et al., 2005; Vora et al., 2006). En conséquence, le protocole UKALL2003 ne comportait que de la DEX et les patients atteints de LAL-T présentèrent un gain en EFS à 86% et 90% en survie globale (OS, *Overall Survival*) (Vora et al., 2008). La prescription de DEX s'accompagne cependant d'un risque plus élevé d'infections et d'autres complications potentiellement sévères justifiant une surveillance particulièrement attentive de ses patients (Möricke et al., 2016). Bien que le protocole COG AALL0434 rapporte d'excellent résultats en utilisant de la PRED dans les LAL-T, dans cette étude tous les patients de risques intermédiaires et de hauts risques recevaient une irradiation crano-spinale (ICS) ne permettant donc pas de conclure sur l'efficacité de la PRED dans la prévention du risque de rechute NM (Hayashi et al., 2020).

3- Supprimer l'irradiation crano-spinale dans les LAL-T Dans une optique de diminution de la toxicité iatrogène tout en maintenant une efficacité thérapeutique, un certain nombre de groupes coopérateurs, à la fois aux Etats-Unis et en Europe, ont cherché à éliminer l'irradiation CS des schémas de traitement de LAL-T en la remplaçant par une intensification thérapeutique systémique et une augmentation du nombre d'intrathécales. Ces études ont confirmé l'efficacité de cette approche puisque les patients traités sans ICS présentaient un taux de rechute compris entre 3 à 8%, un taux comparable aux patients traités avec ICS (De Moerloose et al., 2012; Jeha et al., 2019; Pui et al., 2009). Les stratégies d'intensification thérapeutiques étaient différentes entre les études et incluaient une combinaison d'IT triple, de cures de méthotrexate à haute dose (HD-MTX), des doses plus élevées d'asparaginase et l'utilisation de DEX mais permirent de démontrer la possibilité de se passer de l'ICS chez la plupart des enfants atteints de LAL-T. Dans ce contexte à la fois d'utilisation de la DEX et de restriction des indications d'ICS, l'essai du COG AALL1231 combinait plusieurs

stratégies (Teachey et al., 2020). Il s'agissait d'une étude de phase III, où étaient randomisés les patients atteints de LAL-T ou de lymphomes lymphoblastiques T (LBL-T) âgés de 1 à 30 ans pour recevoir un protocole de type BFM avec ou sans Bortezomib au moment de l'induction et de l'intensification retardée (IR). Uniquement les patients de très haut risque (THR) définis par un envahissement médullaire persistant à J29 ou une MRD en fin de consolidation > 0.1% ou la présence d'une atteinte du SNC au diagnostic, recevaient une ICS. S'appuyant sur les résultats de l'UKALL MRC, la DEX était le stéroïde de choix et les patients recevaient également une dose supplémentaire de PEG-asparaginase durant l'induction et l'IR. Les patients de risque standard (RS) ou intermédiaire (RI) traités par Bortezomib présentaient une amélioration de l'EFS à 3 ans >90% vs 85% pour les 2 groupes, $p < .05$. En revanche les patients THR traités par Bortezomib présentaient un pronostic plus défavorable que le groupe contrôle avec une EFS à 3 ans de 6.5% vs 38% ($p = .004$). Cependant, cette étude se clôtura de façon prématurée, au moment où les résultats de l'essai AALL0434 confirmaient l'intérêt de la Nelarabine en première ligne pour améliorer la DFS (Dunsmore et al., 2020), et ne présentait pas la puissance statistique suffisante pour confirmer l'intérêt de l'ajout du Bortezomib à un protocole de CT standard pour l'ensemble des patients atteints de LAL-T indépendamment du groupe de risque.

- 4- **La Nelarabine est un analogue nucléosidique**, il s'agit de la prodrogue de l'Ara-G qui présente une cytotoxicité spécifique dirigée contre les lymphoblastes T. Il a été précédemment rapporté qu'elle présentait une très bonne diffusion NM et donc conduire à une diminution du risque de rechute NM avec cependant une augmentation du risque de neurotoxicité (Berg et al., 2016).

- 5- **L'addition de la Nelarabine et la comparaison de 2 schémas d'administration du MTX (HD-MTX vs Capizzi ou C-MTX)** ont été récemment évaluées dans un essai randomisé du COG (ALL0434). Antérieur à l'ALL0434, l'essai AALL0232 avait démontré que dans les LAL-B, l'administration du MTX de type HD-MTX et l'utilisation de la DEX donnait de meilleurs résultats que le C-MTX et la PRED (Larsen et al., 2016). Étant donné que la sensibilité au MTX varie entre les LAL-B et les LAL-T, le COG testa les 2 stratégies d'administration dans les LAL-T dans l'essai AALL0434 (Dunsmore et al., 2020). D'autre part, alors que l'activité de la Nelarabine avait été précédemment rapporté en situation de LAL-T réfractaire/rechute (R/R), son

intérêt en première ligne n'était pour l'instant pas clairement démontré. Ainsi cet essai chercha également à évaluer l'intérêt de la Nélarabine dans cette indication. Au final, l'essai AALL0434 comportait 2x2 bras de traitement comparant HD-MTX vs C-MTX avec ou sans Nélarabine articulés autour d'un protocole de type BFM. Entre 2007 et 2015, cette étude fut menée auprès de 1562 patients âgés de 1 à 30 ans et atteints de LAL-T. Tous les patients de RI ou de HR reçurent une ICS et furent randomisés pour recevoir ou non de la Nélarabine. Contrairement aux résultats obtenus dans les LAL-B au cours de l'essai AALL0232, qui soulignait que le HD-MTX était associé à une amélioration du pronostic, le C-MTX donna de meilleurs résultats dans les LAL-T avec une DFS à 5 ans de 91% vs 83, $p = .04$, et une OS de 93% vs 89%, $p = .04$ (Winter et al., 2018). Alors que l'ajout de la Nélarabine permettait une amélioration de la DFS à 5 ans (88% vs. 82%, $p = .03$), ce bénéfice en termes de survie globale (OS) à 5 ans n'était pas significatif (90% vs. 88%, $p = .17$).

Au total, le groupe C-MTX avec Nélarabine présentait la meilleur DFS alors que les patients du groupe HD-MTX sans Nélarabine présentaient la DFS la plus faible (91% vs. 78%, $p = .01$). De façon notable, cette étude rapporta également une diminution du taux de rechute NM dans le groupe des patients traités par Nélarabine (1.3% vs. 6.9%, $p = .0001$).

Concernant de nouveau la Nélarabine, le protocole UKALL14 actuellement en cours, est un essai de phase III où les adultes atteints de LAL-T sont randomisés pour recevoir une chimiothérapie standard associée ou non à de la Nélarabine (NCT01085617).

Dans le même sens, le protocole GRAALL-2014/T évalue chez les patients entre 18 et 59 ans, l'intérêt de l'ajout de la Nélarabine en première ligne chez les patients HR (NCT02619630). Les résultats de cette étude ne sont pas encore connus.

6- Place de l'allogreffe de CSH dans les LAL-T. Étant donné l'amélioration du pronostic des LAL-T au cours des dernières décennies grâce aux perfectionnements des protocoles de chimiothérapies « standards » les indications d'allogreffe de CSH en première intention chez les enfants atteints de LAL-T ont progressivement diminué. Une persistance de la MRD à des niveau de 10^{-3} ou 10^{-4} post-consolidation demeurent des indications d'allogreffe en 1^o intention. Alors que l'allogreffe reste une option thérapeutique pour les patients de THR (moelle envahie à J29, atteinte du SNC) (Jeha et al., 2019) la plupart des experts recommandent de ne prendre en considération que la MRD tardive réalisée en post consolidation dont la positivité doit recommander la greffe

en RC1. Le profil ETP n'est pas non plus une indication d'allogreffe en RC1 tant que ces patients négativent leur MRD post consolidation (Teachey and O'Connor, 2020).

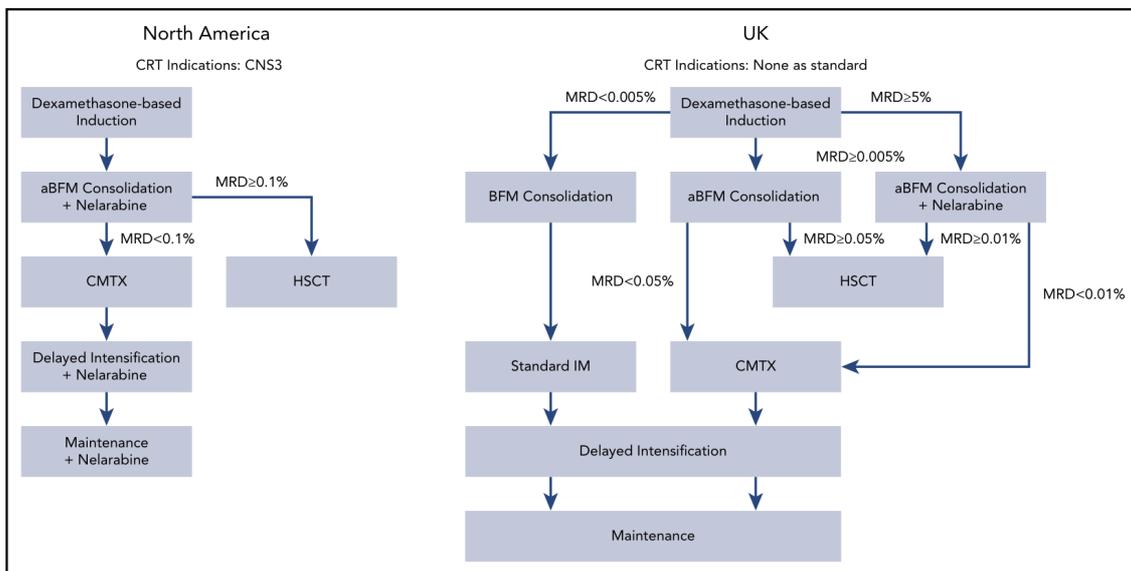


Figure 17 Principes de traitement des LAL-T selon les approches Nord-Américaines et Britanniques (Teachey and O'Connor, 2020)

7- Incorporer les nouvelles stratégies de médecine de précision. Le protocole Total Therapy XVII actuellement en cours aux Etats-Unis, inclus les patients atteints de LAL-B ou T avec pour objectif d'ajouter dans le schéma thérapeutique de nouvelles thérapeutiques ciblées en fonction de la mise en évidence de certaines altérations spécifiques (inhibiteurs de JAK/STAT par exemple) (NCT03117751).

8- Utilisation des protocoles d'inspirations pédiatriques pour les jeunes adultes. En raison des résultats favorables obtenus dans les protocoles de LAL-T pédiatrique, certains groupes d'oncologie adultes ont cherchés à évaluer la faisabilité et l'efficacité de ces protocoles chez les jeunes adultes (Hoelzer et al., 1984; Larson et al., 1995; Marks et al., 2009; Rowe et al., 2005). Aux USA, le *Cancer and Leukemia Group B* (CALGB) 8811 utilisa un protocole de chimiothérapie similaire au protocole pédiatrique CCG-192P en l'associant à une consolidation de type BFM (Larson et al., 1995) avec des doses plus importantes de cyclophosphamide et un recours plus précoce et plus intense à l'asparaginase. Les patients atteints de LAL-T représentaient 22% de cette cohorte et leurs DFS étaient comparables aux formes B ; 57% à 3 ans. D'autres groupes, dont le GRAALL en France et le PETHEMA en Espagne ont également rapportés des résultats positifs en utilisant des protocoles de chimiothérapie inspirés de

la pédiatrie (Ben Abdelali et al., 2011; Huguet et al., 2018; Ribera et al., 2008). Sur la base de ces résultats encourageants démontrant à la fois l'efficacité et la tolérance acceptable de ces protocoles issus des études pédiatriques appliqués aux jeunes adultes, entre 2007 et 2012, l'étude américaine CALGB 10403 recruta 318 adolescents/jeunes adultes (AJA) âgés de 17 à 39 ans, présentant une LAL-B ou T, ces dernières représentant 24% de la cohorte. Les patients atteints de LAL-T reçurent un régime de traitement identique au bras C-MTX du COG AALL0232 (4 phases ; induction, consolidation, *interim maintenance*, intensification retardée et traitement d'entretien). La PRED était prescrite au moment de l'induction puis la DEX l'était au moment de l'intensification et la maintenance. Ces patients recevaient également une irradiation CS prophylactique de 24Gy. Au terme de l'étude, les auteurs ne retrouvèrent pas de différence significative en termes de survie entre les LAL-B et T avec une DFS et une OS respectivement de 66% et 73%. (Stock et al., 2019). Au total, les experts recommandent actuellement de traiter la population des AJA selon des protocoles d'inspiration pédiatrique.

III. Incidence des rechutes de LAL-T

Les patients atteints d'une LAL-T présentent un risque élevé de rechute (Jeha and Pui, 2009; Pieters and Carroll, 2008). Les protocoles thérapeutiques modernes ont permis d'atteindre une survie sans évènement à 5 ans autour de 75%, un résultat qui reste significativement plus défavorable que les LAL-B (Möricke et al., 2008; Pui et al., 2009). Les rechutes sont la principale cause d'échec de LAL-T car elles sont associées à un pronostic extrêmement sombre avec une survie globale inférieure à 20%. De façon notable les rechutes de LAL-T sont plus précoces que les rechutes de LAL-B, survenant majoritairement dans les 2 ans suivant le diagnostic (Hastings et al., 2015).

Dans le protocole FRALLE2000T, l'incidence cumulée de rechute (CIR) selon le classifieur *NFRP* était de 15% (95% CI, 9% to 24%) dans le groupe des patients « Low risk » vs 54% (95% CI, 42% to 66%) chez les patients « High Risk ». La DFS globale dans le FRALLE2000T était de 75% et la survie globale de 79%. Dans le protocole UKALL2003 la DFS était de 86% et la survie globale de 90%.

Les protocoles les plus récents (AALL0334 et AALL1231) rapportent des taux de rechutes inférieures (entre 10 et 15%). La diminution du taux de rechute pourrait s'expliquer par des modalités thérapeutiques différentes (administration du Méthotrexate selon le schéma type Cappizzi par exemple) ainsi que l'ajout de nouvelles thérapeutiques en première ligne (Nélarabine et Bortezomib par exemple).

IV. Mécanismes des rechutes dans les LAL-T

La rechute constitue la principale cause de décès en cas de LAL-T, cependant les mécanismes conduisant à l'évolution de la maladie initiale à la rechute sont encore mal compris notamment en raison de la grande hétérogénéité inter-individuel (Bhojwani and Pui, 2013; Schrappe et al., 2011). L'acquisition de nouvelles mutations et de modifications épigénétiques sont des composantes essentielles dans le processus d'apparition d'une rechute. (Kunz et al., 2015; Oshima et al., 2020; Van Vlierberghe and Ferrando, 2012; Vicente and Cools, 2015; Yadav et al., 2016). Notamment l'acquisition de mutation activatrices de la nucléosidase *NT5C2* qui est acquise dans plus de 20% des patients à la rechute (Meyer et al., 2013; Tzoneva et al., 2018, 2013). Ces mutations dont la distribution est le plus souvent de nature sous-clonale sont associées à une chimiorésistance, *in vitro* et *ex vivo*, conférant une résistance aux analogues des purines qui ont une place centrale au cours du traitement d'entretien des LAL.

Les mutations de *TP53* sont également acquises dans près de 10 à 15% des rechutes de LAL-T et prédisent un taux d'échec thérapeutique élevée associées à une survie globale extrêmement défavorable (Hof et al., 2011; Hsiao et al., 1994; Richter-Pechańska et al., 2017).

Les altérations de la voie RAS-MAPK sont également retrouvées dans un grand nombre de rechute de LAL-T (environ 35% des cas) (Irving et al., 2014) et sont associées à un pronostic défavorable. (Gianfelici et al., 2016). Les mutations activatrices de la voie RAS-MAPK ont été rapportées à la fois dans des clones qui disparaissent à la rechute mais également dans des clones qui émergent au moment de la rechute. De façon notable, l'acquisition de telles mutations semblent associées à une résistance au méthotrexate alors qu'elles sensibiliseraient les blastes aux poisons du fuseau comme la vincristine (Oshima et al., 2016).

Kunz et al. ont analysé les mécanismes moléculaires impliqués dans la rechute des LAL-T en analysant par *whole exome sequencing*, *ultra-deep sequencing*, *multiplex ligation dependent probe amplification* (MLPA) et *DNA methylation array* une série de 13 patients au moment du diagnostic, de la rémission et de la rechute (Kunz et al., 2015). Leur analyse a

permis de montrer qu'entre le diagnostic et la rechute le nombre de mutation (*single nucleotide variants* et petites insertions/délétions) doublait, passant de 11.5 à 26 mutations par patient. Leur approche en *ultra-deep sequencing* a également permis de détecter un certain nombre de sous clones présents au diagnostic et sélectionnés au moment de la rechute. L'analyse du *pattern* mutationnel les a conduits à proposer l'existence de 2 types de rechutes. Alors que les 2 types de rechutes sont caractérisés par la sélection de sous clones et l'acquisition de nouvelles mutations, les rechutes de « type 1 » semblaient dériver de la 1° LAL-T alors que les rechutes de « type 2 » prenaient leur origine au niveau d'un ancêtre leucémique commun mais dont le profil mutationnel avait évolué et dérivé à partir de cet ancêtre commun. Parmi ces mutations spécifiques de la rechute on retrouvait des mutations impliquées dans les mécanismes de résistance à la chimiothérapie comme les mutations de la nucléosidase NT5C2 et des mutations de modulateurs épigénétiques comme SUZ12, WHSC1 et SMARCA4.

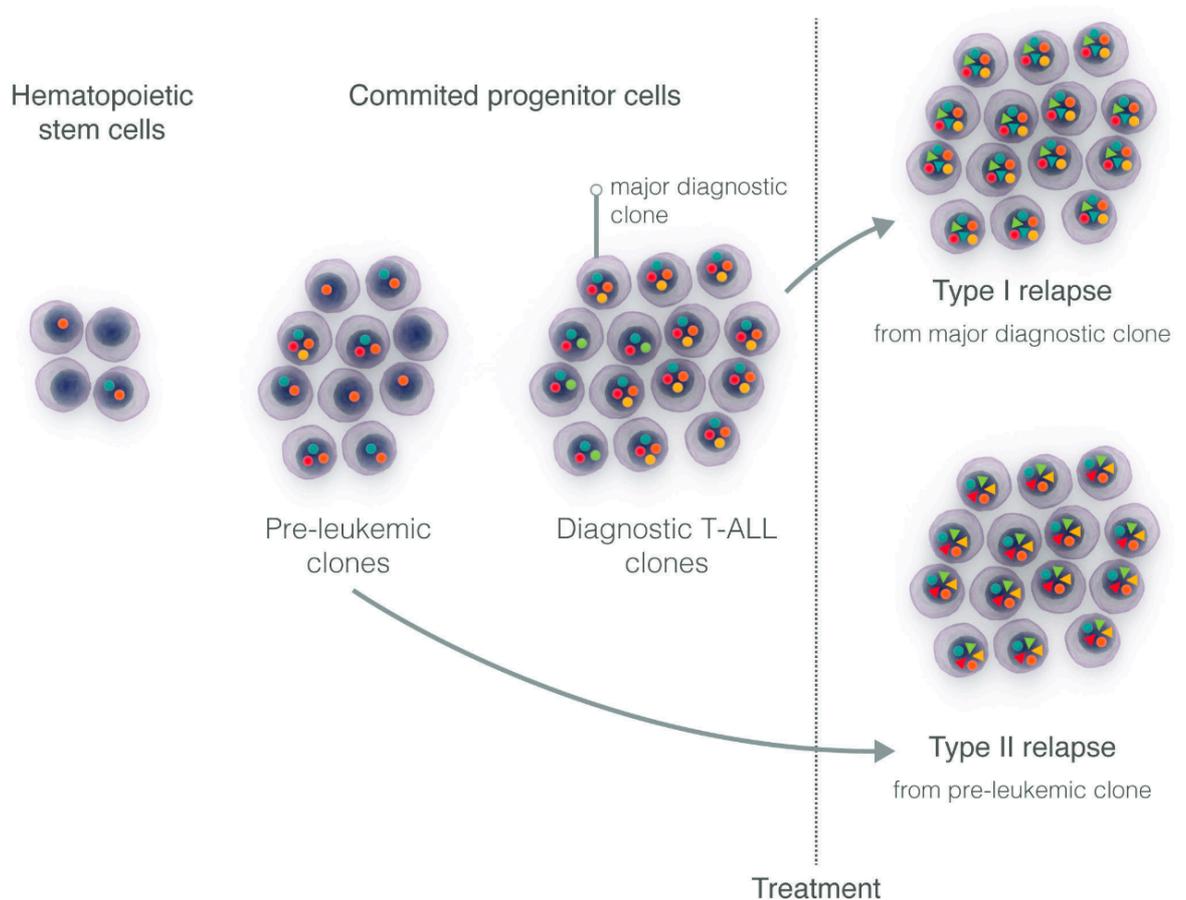


Figure 18 Représentation schématique de l'évolution clonale des LAL-T entre le diagnostic et la rechute

Modèle d'acquisition de mutations par étapes. Selon *Kuntz et al.* le clone responsable de la rechute pourrait provenir d'un clone pré-leucémique dont l'acquisition de nouvelles mutations conduiraient à la rechute (rechute de type II) ou bien provenir du clone déjà présent au diagnostic mais qui aurait acquis de nouvelles mutations (rechute de type I) (*Vicente and Cools, 2015*).

Chimiorésistance et évolution clonale à la rechute

Le profilage moléculaire d'échantillons de LAL-T au diagnostic et à la rechute a permis d'identifier des mutations spécifiquement acquises au moment de la rechute et associées à une chimiorésistance comme les mutations de *NT5C2* et *PRPS1* (impliqués dans la résistance au 6-MP) (Tzoneva et al., 2018, 2013, p. 2) ou de *CREBBP* (Mullighan et al., 2011) impliquées dans la résistance aux glucocorticoïdes. De plus, l'analyse de l'évolution clonale et de la signature mutationnelle entre le moment du diagnostic et celui de la rechute renforcent l'hypothèse d'un trajet non linéaire dans la phylogénie clonale entre ces 2 états (Li et al., 2020).

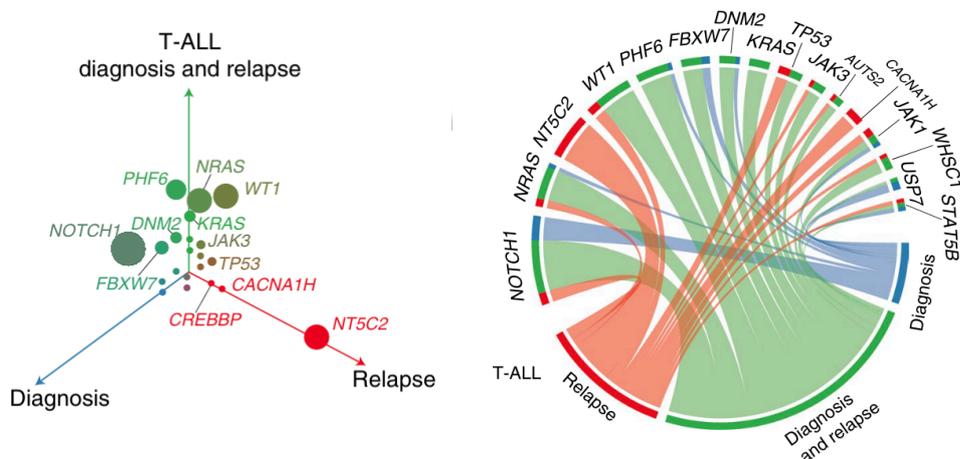


Figure 19 Paysage mutationnel à la rechute des LAL-T

(A) Représentation tri-dimensionnelle du profil d'acquisition/perse/persistance des mutations entre le diagnostic et la rechute dans les LAL-T. La taille de chaque cercle est proportionnelle au nombre de mutations observées.

(B) Le circo plot représente la distribution des mutations entre le diagnostic et la rechute. Les mutations uniquement présentes au diagnostic (en bleu), les mutations présentes à la fois au diagnostic et à la rechute (en vert) et les mutations acquises spécifiquement à la rechute (en rouge). (Oshima et al., 2020)

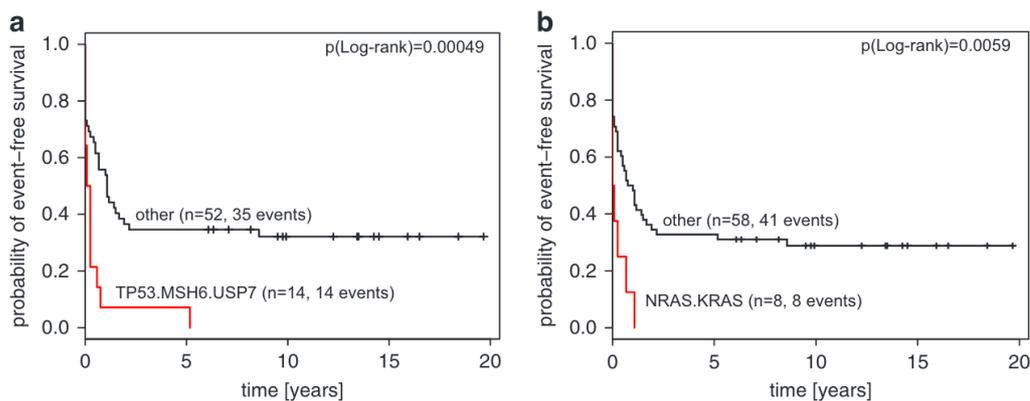


Figure 20 Impact pronostique des mutations de *TP53*, *MSH6*, *USP7* et des mutations de *N-K-RAS* à la rechute

La présence de mutations de *TP53*, *MSH6* et/ou de *USP7* et les mutations de *N-K-RAS* sont associées à un pronostic particulièrement péjoratif dans les LAL-T en rechute (Richter-Pechańska et al., 2017)

V. Pronostic des rechutes de LAL-T

Le pronostic des patients en rechute est extrêmement défavorable avec uniquement 15 à 20% de patients susceptibles de présenter une rémission durable après une deuxième ligne de traitement (Einsiedel et al., 2005) et seule l'allogreffe de moelle réalisée à la suite de la mise en RC2 permet d'assurer une guérison à long terme de ces patients.

La survie post-rechute est donc particulièrement défavorable (<20%) avec seulement que peu de progrès réalisés au cours des dernières années notamment dans le champ du développement de nouvelles thérapeutiques (Einsiedel et al., 2005; Reismüller et al., 2009; Rheingold et al., 2019). Alors qu'un pourcentage significatif de patients présentant une rechute de LAL-B peuvent être guéris, d'autant plus depuis l'émergence et le développement des CAR-T cell, les rechutes de LAL-T conservent une survie globale inférieure à 15-20% (Einsiedel et al., 2005; Raetz et al., 2016). En termes de stratification du risque à la rechute, on notera que les rechutes de LAL-T ne sont jamais considérées comme de risque standard, contrairement aux LAL-B (Figure 21).

Risk stratification of relapsed ALL in ALLR3 and ALL-REZ BFM 2002.

Immunophenotype Site of relapse Time point of relapse	B-cell precursor			T-cell ALL		
	Isolated extramedullary	Combined bone marrow	Isolated bone marrow	Isolated extramedullary	Combined bone marrow	Isolated bone marrow
Very early	HR/IR*	HR	HR	HR/IR*	HR	HR
Early	IR	IR	HR	IR	HR	HR
Late	SR	IR	IR	SR	HR	HR

HR, high risk; IR, intermediate risk; SR, standard risk; ALL, acute lymphoblastic leukaemia.

HR/IR* were HR in *ALLR3* and IR in *ALL-REZ BFM 2002* and excluded from this study. Patients classified as HR categories in bold are included in this analysis.

Figure 21 Classification en groupe de risque des rechutes de LAL

Ce tableau représente la stratification du risque à la rechute dans les LAL selon les protocoles ALLR3 et ALL-REZ-BFM2002. Cette stratification repose sur différents critères dont la combinaison permet de définir l'intensité du risque à la rechute. Le délai à la rechute, la présence d'une atteinte médullaire et/ou extra-médullaire permettent de définir 3 groupes de risques ; standard, intermédiaire et haut risque. On remarque que les LAL-T en rechute, contrairement au LAL-B ne sont jamais considérées comme étant des rechutes de « Standard Risk » (SR) selon ces classifications (Eckert et al., 2021).

VI. Place des nouvelles thérapeutiques dans les LAL-T réfractaires ou en rechutes (R/R)

En cas de rechute, chez les enfants, l'attitude recommandée actuellement repose sur une ré-induction suivie par une allogreffe en cas d'obtention d'une mise en 2° rémission complète (Hunger and Raetz, 2020). L'étude NECTAR (NCT00981799) était une étude de phase 1 menée

chez des patients âgés de 1 à 21 ans présentant une 1^o rechute de LAL-T ou de LBL-T qui associait de la Nélarabine à de l'étoposide et du cyclophosphamide. Parmi les 9 patients atteints de LAL-T, 44% d'entre eux présentèrent une réponse (Whitlock et al., 2014).

Le Venetoclax est un inhibiteur de BCL2 qui a été étudié en association avec le Navitoclax (inhibiteur mixte de BCL-XL et BCL-2) au cours d'une phase 1 chez des enfants et des adultes dont 19 présentaient une LAL-T R/R (Pullarkat et al., 2021). Le taux global de mise en RC était de 60% et 28% des patients reçurent une allogreffe ou une injection de CAR-T cell au décours.

Il existe également des descriptions de cas décrivant l'efficacité de l'association Venetoclax-Decitabine (Kong et al., 2022; Zappone et al., 2020) ou encore du Venetoclax en association avec de la chimiothérapie classique (Numan et al., 2018) chez un patient présentant une LAL-T ETP en rechute. L'association Venetoclax-Bortezomib a également été rapportée dans une série de 3 patients, dont 2 ayant obtenus une 2^o RC permettant une allogreffe au décours (La Starza et al., 2019).

L'essai du AALL07P1 était une étude de phase 2 qui analysait l'apport du Bortezomib au moment de la ré-induction chez les patients pédiatriques en situation de LAL-T ou de LBL-T en rechute. Parmi les 22 patients présentant une LAL-T en rechute, le taux de RC2 était de 68% (Horton et al., 2019). Devant ces résultats positifs le protocole AALL1231 du COG fut mis en place afin d'évaluer l'effet du Bortezomib en première ligne dans les LAL-T/LBL-T.

Le Daratumumab et l'Isatuximab sont des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD38 dont les premières études cliniques ont porté chez les patients atteints de myélome multiple. Les modèles pré-cliniques ont permis de démontrer l'efficacité du Daratumumab dans les LAL-T (Bride et al., 2018). Une phase 2 est actuellement en cours, étudiant la tolérance et l'efficacité de l'ajout du Daratumumab à une chimiothérapie standard chez les patients âgés de 1 à 30 ans présentant une LAL-T (ou B) R/R (NCT03384654). Les résultats préliminaires de cette étude ont été présentés à l'ASCO en 2022, 24 patients pédiatriques et 5 patients AJA présentant une LAL-T en 1^o rechute ou réfractaire à une première ligne de traitement. Parmi les patients pédiatriques 40% d'entre eux ont obtenu une RC après un cycle de CT + Daratumumab, le taux de réponse globale (RC + RCi ; RC avec récupération hématologique incomplète) était de 83% chez les patients pédiatriques et de 60% (tous en RC) chez les AJA. A noter la survenue d'un décès secondaire à une toxicité du traitement (œdème cérébral et insuffisance hépatique). Cette étude incluait également des patients présentant un LBL-T, 10 patients âgés de 1 à 30 ans, chez qui l'ajout du Daratumumab permettait d'obtenir taux de

réponse globale (ORR, Overall Response Rate) inférieure à celle obtenue dans les LAL-T ; ORR = 40% (tous en RC cependant) (Hogan et al., 2022). A l'instar du Daratumumab, l'Isatuximab est également en cours d'évaluation dans une étude de phase 1/2 (NCT03817320) dans cette indication.

Contrairement aux formes B, les LAL-T associées à des remaniements de *ABL1* sont rares. L'altération la plus fréquente impliquant *ABL1* dans les LAL-T est représentée par la fusion de *NUP214-ABL1* secondaire à une amplification épisomale de la région 9p34. Les fusions *NUP214-ABL1* ont été décrites dans près de 5 à 10% des LAL-T (le plus souvent à des niveaux sous-clonaux) et confèrent à ces dernières une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosines kinases comme l'imatinib, le nilotinib ou le dasatinib. En 2009 fut rapporté le 1^o cas d'un patient présentant une LAL-T avec une fusion de *NUP214-ABL1* ayant été mis en RC avec du Dasatinib (Deenik et al., 2009). D'autres remaniements impliquant *ABL1* ont été récemment identifiées dans de très rares cas de LAL-T (*ZBTB16-ABL1* et *ZMIZ1-ABL1*) qui présentaient une sensibilité aux ITK dans des modèles précliniques (Chen et al., 2018). A noter qu'il existe également de rares cas de LAL-T avec un transcrit *BCR-ABL1*, également sensibles aux ITK (Raanani et al., 2005; Ragg et al., 2019). Par ailleurs, il semblerait qu'un certain nombre de LAL-T pourtant dépourvue de remaniement *ABL1* seraient associées à une sensibilité accrue aux ITK. Identifier ces LAL-T qui pourraient bénéficier des ITK est un axe de recherche majeur actuellement (Frismantas et al., 2017; Gocho et al., 2021).

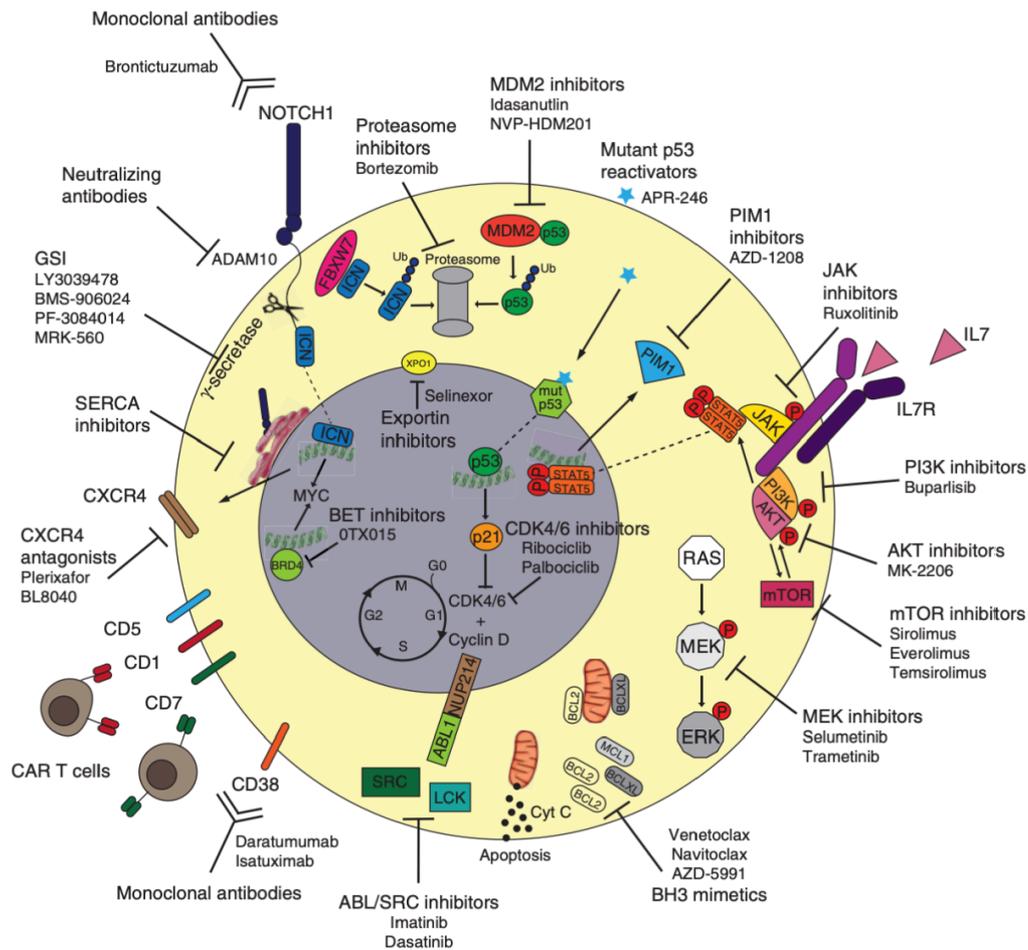


Figure 22 Représentation des nouvelles cibles thérapeutiques dans les LAL-T (Cordo' et al., 2021)

A la lumière des études précliniques ayant rapporté l'efficacité de l'inhibition des régulateurs du cycle cellulaire CD4 et CDK6, le COG a mis en place l'étude AINV18P1 (NCT03792256), menée chez des patients âgés de 1 à 30 ans en situation de LAL-T ou B en rechute, cette étude évalue donc l'intérêt de l'ajout d'un inhibiteur de CDK4/6 (Palbociclib) à la fois en monothérapie et également en association avec de la chimiothérapie. Les résultats préliminaires de cette étude ont été rapportés récemment confirmant la sécurité d'utilisation et l'analyse étendue de l'étude est en cours (Raetz et al., 2020).

Les dérégulations de la voie JAK-STAT sont retrouvées dans près de 30% des LAL-T (Kim et al., 2020). L'activation de la voie IL7 est une conséquence des mutations activatrices du récepteur à l'IL7 (*IL7R*) ou des effecteurs de la voie d'aval (*JAK1/3*, *STAT5B*).

L'activation de la voie IL7 conduit à une *up-regulation* des molécules anti-apoptotique BCL2 et PIM1 contribuant en partie à la corticorésistance observée dans les LAL-T « *IL7 dérégulée* » (De Smedt et al., 2020).

Le Ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/2, utilisé en clinique dans le traitement de certaines hémopathies myéloïdes et en cas de GVH sévère, conduit à une inhibition de la voie JAK-STAT indépendamment de la présence de mutations affectant la voie IL7.

Le Ruxolitinib présente une efficacité dans des modèles pré-cliniques de LAL-T de type ETP (Maude et al., 2015) et pourrait également fonctionner en synergie avec la dexaméthasone pour lever la corticorésistance induite par l'activation de la voie IL7. De nombreux essais cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité des inhibiteurs de JAK dans les LAL-T « *JAK-STAT dérégulées* » (NCT03613428, NCT03117751, NCT03515200).

La voie PI3K/AKT/mTOR est dérégulée dans 20% des LAL-T (Gutierrez et al., 2009). Cette activation est en lien avec les pertes de fonctions de *PTEN*, le régulateur négatif de la voie PI3K, ou en cas de mutations activatrices de *PIK3CA*, *PIK3R1* et/ou d'*AKT1*. L'inhibition de cette voie a montré son efficacité dans des modèles pré-cliniques de LAL-T révélant notamment une synergie avec certaines chimiothérapies utilisées en clinique (doxorubicine, corticoïdes et Nelarabine par exemple) (Lonetti et al., 2016, 2014). La combinaison d'inhibiteur de mTOR avec des inhibiteurs de CDK est actuellement étudiée dans une étude de phase 1 associant le Ribociclib avec de l'Everolimus et de la Dexaméthasone chez les patients âgés de 1 à 30 ans présentant une LAL-T (ou B) en situation R/R (NCT03740334).

Alors que le développement des inhibiteurs de γ sécrétase (GSI) non spécifique était suspendu en raison d'une toxicité digestive non acceptable, la mise au point d'un GSI spécifique de la sous-unité presenilin-1 (*PSEN1*) une sous-unité participant à la formation du complexe composant les γ sécrétases, a fait la preuve récemment d'un profil de toxicité réduit et d'une activité pré-clinique intéressante dans des LAL-T *NOTCH1^{Mut}* (Habets et al., 2019) relançant l'intérêt du développement d'inhibiteurs de la voie Notch1 dans les LAL-T *NOTCH1^{Mut}*.

Enfin, concernant la mise au point de CAR-T cell dans le champ des LAL-T, les perspectives de leur utilisation, jusqu'ici freiné en raison des complications inhérentes à leur utilisation (aplasie T et lutte fratricide en CAR-T), commence à devenir une réalité. Ainsi, une étude de phase 1 a récemment rapporté les résultats de CAR-T ciblant le CD7, rapportant une absence de lutte fratricide et une mise en RC chez 5 patients sur 8 avec un profil de toxicité acceptable (Zhang et al., 2020).

Therapeutic agent	Target	Association with T-ALL subtype/ outcome	Trial identifier and year posted on clinicaltrials.gov	Tumor type	Phase/status	Results
BH3 mimetics						
Venetoclax (ABT-199)	Higher BCL2 expression	Higher in ETP-ALL	NCT03236857 (p, ya); 2017	R/R malignancies	I (R)	
			NCT03808610 (a); 2019	R/R ALL (with chemo)	I/II (R)	
Navitoclax (ABT-263)	Higher BCL2 and BCLXL expression		NCT00406809 (a); 2006	R/R lymphoid malignancies	I/II (C)	Thrombocytopenia and neutropenia (Wilson et al., 2010)
			NCT03181126 (p, a); 2017	R/R ALL or LBL (with chemo)	I (A)	
AZD-5991	Higher MCL1 expression		NCT03218683 (a); 2017	R/R hematologic malignancies (also with venetoclax)	I (A)	
NOTCH1 inhibitors						
Brontictuzumab (OMP-52M51)			NCT01703572 (a); 2012	R/R lymphoid malignancies	I (C)	
γ-secretase inhibitors						
LY3039478	<i>NOTCH1</i> activating mutations	Favourable outcome	NCT02518113 (p, a); 2015	T-ALL/T-LBL (with dexamethasone)	I/II (C)	
BMS-906024			NCT01363817 (a); 2011	R/R T-ALL/LBL (alone or in combination with dexamethasone)	I (C)	
PF-3084014			NCT00878189 (ya; a); 2009	R/R T-ALL/LBL and solid tumors	I (C)	Anti T-ALL activity (Papayannidis et al., 2015)
CXCR4 inhibitors						
Plerixafor (AMD3100)			NCT01319864 (p, a); 2011	R/R ALL, AML, and MSD (with cytarabine and etoposide)	I (C)	No response in ALL patients (Cooper et al., 2017)
BL-8040			NCT02763384 (a); 2016	R/R T-ALL/LBL (with nelarabine)	II (R)	
BET inhibitors						
OTX015 (MK-8628)	BRD4 activity; aberrant Myc activity		NCT01713582 (a); 2012	R/R acute leukemia and MM	I (C)	
GSK525762			NCT01943851 (a); 2013	R/R hematologic malignancies	I/II (C)	

ABL/SRC inhibitors						
Dasatinib	<i>ABL1</i> fusions		NCT03117751 (p); 2017	Dx ALL/LL (with chemo)	II/III (R)	
Imatinib			NCT02551718 (p, a); 2015	R/R acute leukemia	N/A (R)	
JAK1/2 inhibitor						
Ruxolitinib	<i>IL7Ra</i> , <i>JAK1/3</i> and <i>STAT5B</i> mutations	Higher in ETP-ALL; associated with steroid resistance	NCT01251965 (ya, a); 2010	R/R ALL/AML	I/II (T)	No clinical benefit *
			NCT03613428 (p, a); 2018	R/R ETP-ALL (with chemo)	I/II (NR)	
			NCT03117751 (p); 2017	Dx ALL/LL (with chemo)	II/III (R)	
			NCT03515200 (p, ya); 2018	R/R ALL (with chemo)	I (T)	
Pan-PI3K inhibitors						
Buparlisib (BMK120)	<i>PIK3R1</i> and <i>PIK3CA/D</i> mutations; <i>AKT</i> mutations; <i>PTEN</i> deletions;	Poor prognosis, therapy failure and relapse	NCT01396499 (a); 2011	R/R acute leukemia	I (C)	
			NCT01833169 (a); 2013	PIK3-activated solid and hematologic malignancies	II (C)	
NCT02711852 (a); 2016			R/R hematologic malignancies	II (A)		
NCT03742323 (a); 2018			R/R ALL	I/II (R)		
NCT00968253 (p, a); 2009			R/R ALL (with chemo)	I/II (C)	The combination is tolerated with moderate activity in T-ALL (Daver et al., 2015)	
NCT01523977 (p, ya); 2012			R/R ALL (with chemo)	I (C)	The combination is feasible (Place et al., 2018)	
NCT00874562 (p, a); 2009			R/R ALL (with steroids)	I (C)		
NCT03740334 (p,a); 2018			R/R ALL (with dexamethasone and ribociclib)	I (R)		
Temsirolimus (CCI-799)	NCT00084916 (a); 2004	R/R leukemia	II (C)			
	NCT01403415 (p, ya); 2011	>2 relapses ALL/LBL (with re-induction chemo)	I (C)	Excessive toxicity (Rheingold et al., 2019)		
	NCT01756118 (a); 2012	R/R acute leukemia	I (A)			
Dual PI3K/mTOR inhibitors						
Dactolisib (NVP-BEZ235)						

AKT inhibitors			NCT01231919 (p, ya); 2010	R/R solid tumors or leukemia	I (C)	
MK-2206 (allosteric)						
MEK inhibitors						
Selumetinib	<i>NRAS/ KRAS</i> mutations	Higher in ETP-ALL; associated with steroid resistance	NCT03705507 (p, a); 2018	R/R ALL (with dexa)	I/II (R)	
Trametinib			NCT00920140 (a); 2009	R/R leukemias	I/II (C)	
			NCT02551718 (p, a); 2015	R/R acute leukemias	N/A (R)	
Binimetinib (MEK162)			NCT01885195 (a); 2013	RAS/RAF/MEK-activated malignancies	II (C)	
CDK4/6 inhibitors						
Ribociclib (LEE011)	<i>CDKN2A/B</i> down-regulation; <i>CDKN1B</i> deletions; <i>CCND3</i> up-regulation	Lower incidence in ETP-ALL	NCT02187783 (a); 2014	CDK4/6-activated tumors	II (C)	
			NCT03740334 (p, a); 2018	R/R ALL (with dexa and everolimus)	I (R)	
			NCT02813135 (p); 2016	R/R cancer	I/II (R)	
			NCT03792256 (p); 2019	R/R ALL/LL (with re-induction chemo)	I (R)	
			NCT03132454 (ya, a); 2017	R/R leukemia (with sorafenib, decitabine or dexa)	I (R)	
Palbociclib (PD-332991)			NCT03515200 (p, ya); 2018	R/R ALL (with chemo)	I (T)	
Purine analog						
	Rapid DNA synthesis		NCT02551718 (p, a); 2015	R/R acute leukemia	N/A (R)	
Nelarabine			NCT00866671 (p, ya); 2009	R/R T-ALL/LBL with ≥ 2 prior treatments	IV (C)	The risk-benefit profile is positive (Zwaan et al., 2017)
			NCT00408005 (p, ya); 2006	Dx T-ALL/LBL	III (A)	Increased disease-free survival rate (Dunsmore et al., 2020)
MDM2 inhibitors						
Idasanutlin	MDM2 over-expression		NCT04029688 (p, ya); 2019	R/R acute leukemia or solid tumors (with chemo or venetoclax)	I/II (R)	
HDM201			NCT02143635 (a); 2014	p53-WT advanced tumors, including ALL	I (C)	

ALRN-6924			NCT03654716 (p, ya); 2018	Pediatric cancer, including R/R ALL	I (R)	
Immunotherapy						
Daratumumab	CD38 expression		NCT00501826 (p, a); 2007	T-ALL/T-LBL (with chemo)	II (R)	
			NCT03384654 (p); 2017	R/R ALL/LBL (with chemo)	II (R)	
Isatuximab			NCT03860844 (p); 2019	R/R ALL or AML (with chemo)	II (R)	
CAR T						
Anti-CD5 CAR T	CD5 expression		NCT03081910 (p, a); 2017	R/R T-cell malignancies	I (R)	
Anti-CD7 CAR T	CD7 expression		NCT03690011 (p, a); 2018	R/R T-cell malignancies	I (NR)	
OTHER DRUGS						
XPO1 inhibitor						
Selinexor (KPT-330)	Nuclear export of oncogenic proteins/ mRNA		NCT02212561 (p, ya); 2014	R/R ALL, AML, or MSD	I (C)	Drug is safe with promising activity (Alexander et al., 2016)
			NCT02091245 (p, ya); 2014	R/R ALL and AML	I (A)	
HDAC inhibitors						
Panobinostat	High HDAC expression and activity		NCT00723203 (a); 2008	R/R ALL or AML	II (T)	Lack of efficacy *
			NCT02518750 (p); 2015	R/R T-ALL/LBL (with bortezomib and chemo)	II (T)	Slow accrual *
			NCT01321346 (p); 2011	R/R acute leukemias (with cytarabine) and lymphomas	I (C)	
Vorinostat			NCT03117751 (p); 2017	Dx ALL/LBL (with chemo)	II/III (R)	
			NCT01483690 (p, ya); 2011	R/R ALL (with decitabine and chemo)	I/II (T)	Excessive toxicity *
			NCT02553460 (p); 2015	Dx ALL (with bortezomib and chemo)	I/II (R)	
Methyltransferase inhibitors						
5-Azacitidine	DNA methyltransferase activity		NCT02551718 (p,a); 2015	R/R acute leukemias	N/A (R)	
			NCT01861002 (p); 2013	R/R ALL or AML (with chemo)	I (C)	
Decitabine			NCT02551718 (p, a); 2015	R/R acute leukemias	N/A (R)	

			NCT01483690 (p, ya); 2011	R/R ALL (with vorinostat and chemo)	I/II (T)	Excessive toxicity *
			NCT00349596 (p, a); 2006	R/R ALL	I (C)	
			NCT03132454 (ya, a); 2017	R/R ALL or AML (with palbociclib)	I (R)	
Proteasome inhibitors						
Bortezomib	Rapid protein turnover		NCT02518750 (p); 2015	R/R T-ALL/LBL (with chemo)	II (T)	Slow accrual *
			NCT02553460 (p); 2015	Dx ALL (with vorinostat and chemo)	I/II (R)	
			NCT02551718 (p, ya); 2015	R/R acute leukemias	N/A (R)	
			NCT00440726 (p); 2007	R/R ALL (with chemo)	I/II (C)	
			NCT04224571 (p, ya); 2020	R/R ALL (with chemo)	II (R)	
			NCT00873093 (p, a); 2009	1st relapse ALL/LBL (with chemo)	II (C)	Promising results for T-ALL (Horton et al., 2019)
			NCT02112916 (p, ya); 2014	Dx T-ALL-LBL (with chemo)	III (A)	
			NCT03590171 (p); 2018	R ALL (with chemo)	II (R)	
			NCT03117751 (p); 2017	Dx ALL/LBL (with chemo)	II/III (R)	
			NCT03643276 (p); 2018	Dx ALL (with chemo)	III (R)	
NAE inhibitor						
Pevonedistat (MLN49243)			NCT03349281 (ya, a); 2017	R/R ALL (with chemo)	I (R)	
AURK inhibitors						
Alisertib	AURK over expression		NCT01154816 (p, ya); 2010	R/R ALL, AML, and solid tumors	II (C)	Response rate <5% (Mossé et al., 2013)
AT-9283			NCT01431664 (p); 2011	R/R acute leukemia	I (C)	No efficacy (Vormoor et al., 2017)

Ce tableau récapitule l'ensemble des essais de nouvelles molécules actuellement en cours dans le champ des LAL-T (au diagnostic, en rechute ou réfractaire). Adapté de Cordo et al. 2021.

* Source: <https://clinicaltrials.gov/>

Abbreviations: p= pediatric, ya= young adult, a= adults; ALL= acute lymphoblastic leukemia, LBL= lymphoblastic lymphoma, AML= acute myeloid leukemia, MDS= myelodysplastic syndrome, MM= multiple myeloma, Dx= newly diagnosed, R/R= refractory/relapsed; chemo= chemotherapy; dexa= dexamethasone; WT= wild-type; N/A= not applicable, R= recruiting, A= active, C= completed, T= terminated, NR= not yet recruiting.

VII. Comment améliorer la prédiction du risque de rechute dans les LAL-T ?

Prédire les patients à risque de rechutes de LAL-T présente un intérêt clinique majeur. Ainsi ces patients pourraient bénéficier, d'emblée, soit d'une intensification thérapeutique (avec ou sans allogreffe de CSH) soit de thérapies innovantes s'appuyant sur des thérapies ciblées par exemple. Malheureusement, malgré les avancées réalisées ces dernières années dans le domaine de la compréhension de la biologie des LAL-T, il n'existe toujours pas de stratification moléculaire validée dans les LAL-T. À ce jour, seuls les critères s'appuyant sur l'évaluation de la réponse aux traitements (corticosenibilité, chimiosensibilité et surtout évaluation de la MRD post induction et/ou consolidation) demeurent les facteurs pronostiques majeurs dans les LAL-T (Schrappe et al., 2011).

Pourtant, comme dans les LAL-B, certains patients présentant une excellente réponse initiale avec notamment une MRD négative en fin d'induction et/ou de consolidation, vont malgré tout présenter une rechute. On comprend ainsi que les critères d'évaluation thérapeutiques seuls ne permettent pas de déterminer avec précision les patients les plus à risque de rechute justifiant de confronter l'exploration des altérations oncogéniques dans les LAL-T au risque de rechute et/ou de maladie réfractaire afin de faire émerger les critères moléculaires les plus discriminants.

1. Critères historiques de stratification thérapeutique dans les LAL-T

Historiquement les critères définis par le NCI continuent d'être utilisés en pratique clinique dans les LAL-T. Dans le protocole UKALL2003, l'âge, le taux de WBC au diagnostic et la réponse initiale à la chimiothérapie permettaient de déterminer l'intensité du traitement ; Reg. A (age < 10y and WBC < $50 \times 10^9/L$); Reg. B (age > 10y and/or WBC > $50 \times 10^9/L$); or Reg. C (slow early response at d15/8) (Vora et al., 2008). Dans le protocole FRALLE2000T la réponse initiale évaluée à J8, la chimiosensibilité à J21 et la MRD à J35 ($>10^{-2}$) étaient utilisés pour subdiviser les patients en groupe de risque standard et de haut risque (T1 vs T2) (Petit et al., 2018) conduisant à un protocole thérapeutique d'intensité proportionnelle au risque de rechute. Dans le protocole CAALL-F01 (NCT02716233) les LAL-T de risque standard devaient présenter une corticosenibilité à J8, une RC à J35, une MRD en fin de consolidation $< 10^{-4}$ et l'absence d'atteinte initiale du SNC.

2. Place de la MRD dans la prédiction de la rechute des LAL-T

Dans l'étude combinée *AIEOP* (*Associazione Italiana di Ematologia Pediatrica Group*) et *BFM-ALL 2000*, (Schrappe et al., 2011) les patients présentant une MRD négative ($\leq 10^{-4}$) au 78^{ème} jour, et ce indépendamment de la MRD en fin d'induction (évaluée à J33), présentait une incidence cumulée de rechute (CIR, *cumulative incidence of relapse*) comparable aux patients ayant une MRD négative à J33 (8.5% vs 7%), alors que les patients ayant une MRD positive à J78 présentaient une CIR plus élevée qui augmentait de façon proportionnée avec la MRD ; CIR à 26.3% si MRD_{pos} < 10^{-3} , 33% en cas de MRD à 10^{-3} et 44% si MRD > 10^{-3} . Une des raisons pouvant expliquer l'importance de l'évaluation de cette réponse tardive de la MRD pourrait être lié au fait que cette évaluation de la MRD a lieu après la consolidation du protocole 1B, une phase qui comprend 2 cures de cyclophosphamide, de cytarabine et de mercaptopurine, des drogues centrales dans les LAL-T.

Dans l'analyse britannique UKALL03 (O'Connor et al., 2018) il apparaissait que , contrairement aux LAL-B, l'analyse de la MRD post-consolidation était plus informative que la MRD post-induction, en raison d'une clairance plus longue de la MRD dans les LAL-T. La MRD post-consolidation était le facteur pronostique principal et ce indépendamment du niveau de cette MRD (Teachey and Pui, 2019).

Dans le protocole FRALLE2000T, la MRD post-induction avec un seuil à 10^{-2} était utilisée pour diviser les patients en groupe de risque. Le seuil de significativité à 10^{-4} fut mis en évidence au moment de l'analyse rétrospective. Indépendamment du statut oncogénique *NFRP*, la MRD apparaissait comme un facteur pronostique significatif. Parmi les 191 patients analysés, 114 (60%) patients présentaient une MRD < 10^{-4} et 77 (40%) une MRD $\geq 10^{-4}$. Les patients avec une MRD $\geq 10^{-4}$ présentaient une incidence cumulée de rechute significativement plus élevée que les patients dont la MRD était inférieure à 10^{-4} en fin d'induction ; avec une CIR et une DFS de 37.6% et 58.4% vs 13.6% et 86.4% respectivement. Le CSHR (cause-specific hazard of relapse) était de 3.11 (IC95% 1.74-5.57) chez les patients présentant une MRD $\geq 10^{-4}$.

3. Place de la biologie moléculaire dans la prédiction de rechute

a) Mise en évidence du "classifieur" *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* dans les hémopathies T immatures :

1. Chez l'adulte

En 2009, notre équipe a pour la première fois mis en évidence l'existence de facteurs pronostiques moléculaires dans les LAL-T (Asnafi et al., 2009). Ainsi, dans une étude combinant 141 patients issus de 2 protocoles adultes de LAL, GRAALL-2003 et LALA-94, nous avons mis en évidence le pronostic favorable associé à la présence d'une mutation de *NOTCH1* et/ou du gène codant pour son E3 ligase, *FBXW7*. Cette étude a permis d'identifier un sous-groupe majoritaire de patients (101/142, 72%) présentant une mutation de *N/F* (N/F^{Mut}). D'un point de vue pronostic cette population N/F^{Mut} présentait une survie globale et une survie sans évènement supérieures à la population N/F^{WT} (Figure 23) et ce de façon statistiquement significative.

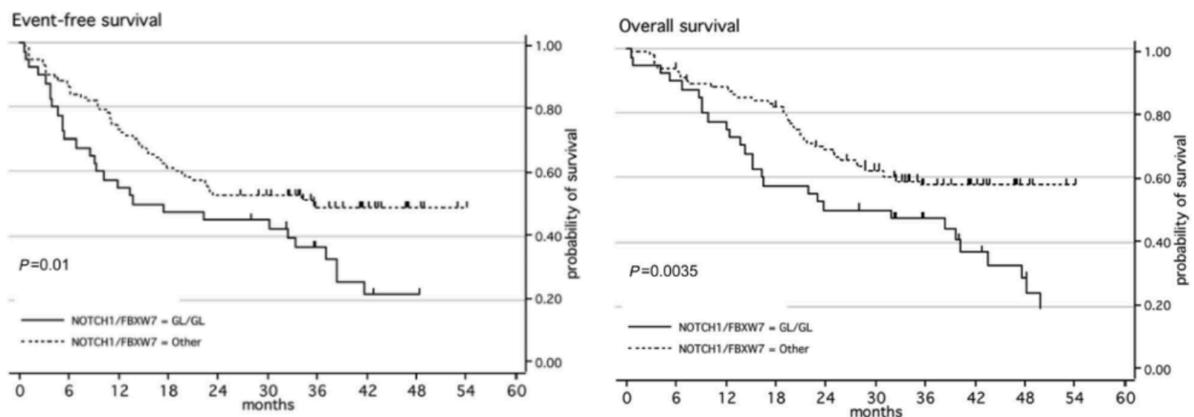


Figure 23 Impact du statut *NOTCH1/FBXW7* dans les cohortes LALA-94 et GRAALL03 (141 patients au total, 101 patients $NOTCH1/FBXW7^{Mut}$ et 40 patient $NOTCH1/FBXW7^{WT}$) (Asnafi et al., 2009)

En 2013, la mise en évidence des mutations de *N/K-RAS* et des altérations de *PTEN* ; (mutations et/ou délétion), dans les LAL-T, a permis d'affiner ce précédent classifier *N/F* en isolant les patients N/F^{Mut} porteurs d'une altération de *RAS* et/ou de *PTEN* (R/P^{Alt}) dont le pronostic était superposable au patient N/F^{WT} . Cette étude fut conduite chez 212 patients du GRAALL-2003 et du GRAALL-2005, et conduit à identifier une mutation *N/F* chez 143 patients (67%) et une altération *R/P* chez 38 patients (18%) (Trinquand et al., 2013b). De façon notable, cette étude démontrait que le pronostic favorable des patients N/F^{Mut} se limitait aux patients N/F^{Mut} sans altération *R/P* (*Classifier Low-Risk (LR)*). Cette population $N/F^{Mut} R/P^{WT}$ présentait une survie globale et une survie sans évènement supérieures au reste de la population d'étude notamment en comparaison avec les patients $N/F^{Mut} R/P^{Alt}$ (Figure 24).

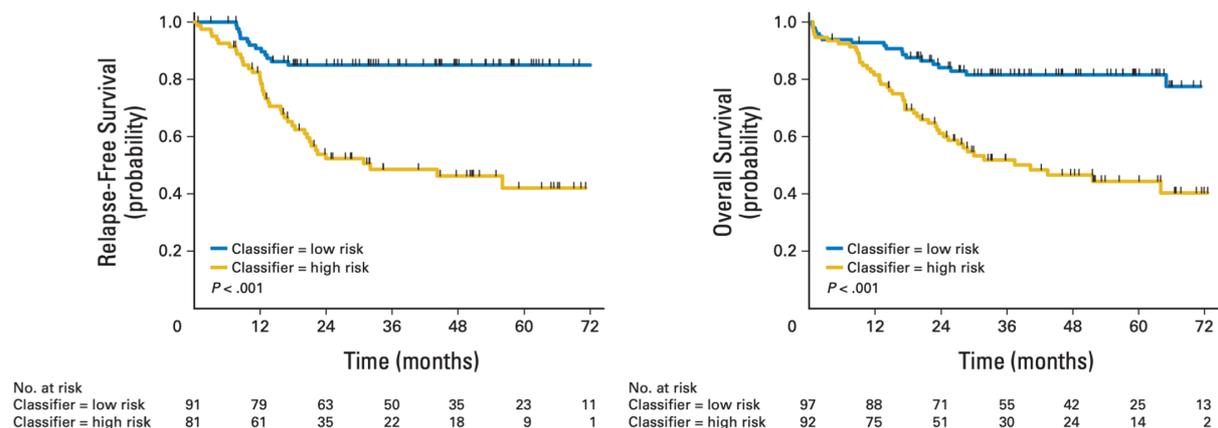


Figure 24 Impact du statut *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* dans les cohortes GRAALL03 et GRAALL05 (Trinquand et al., 2013b)

Confrontation du classifieur *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* (NFRP) à la MRD dans le GRAALL0305

Au sein de la cohorte du GRAALL0305, composée de 212 patients, l'information de la MRD post-induction était connue pour 89 d'entre eux (dont 46 patients classés en *low risk* (LR) et 43 patients en *high risk* (HR) selon le classifieur *NFRP*). En utilisant un seuil de positivité à 10^{-4} , il apparaissait que les patients LR avait une tendance non significative à présenter une MRD négative (74% vs 60%, $p = .18$). En analyse multivariée après ajustement sur le taux de GB (seuil à $100 \times 10^9/L$) et la MRD chez ces 89 patients, le classifieur *NFRP* demeurait le seul facteur pronostic statistiquement significatif en termes de survie globale (OS ; HR, 4.8; 95% CI, 1.6 to 14.8; $p = .006$)

Au final, ce travail fut à l'origine de la première et unique classification pronostique moléculaire dans les LAL-T ayant connu une translation en pratique clinique. Ainsi, le protocole GRAALL-2014 de LAL-T adulte a par la suite intégré ce "classifieur" moléculaire dans l'élaboration de la stratification initiale des LAL-T, considérant que les patients dont le profil moléculaire différait de $N/F^{Mut} R/P^{WT}$ devait être considérés comme des patients à haut risque de rechute et devait recevoir un protocole thérapeutique ajusté à ce risque.

2. Impact du statut *NFRP* dans les LAL-T pédiatriques

En pédiatrie le "classifieur" *NFRP* a également été mis en évidence plus récemment dans une étude portant sur les patients traités dans le protocole pédiatrique FRALLE-2000T.

Dans cette étude, les patients atteints d'une LAL-T $N/F^{Mut} R/P^{WT}$ présentaient des résultats cliniques significativement meilleurs que les autres profils moléculaires (Petit et al., 2018). De façon notable, en combinant l'oncogénétique $NFRP$ à des paramètres clinico-biologiques tels que la MRD post-induction (seuil de positivité à 10^{-4}) et le taux de globules blancs au diagnostic (avec un seuil défini à $200 \times 10^9/L$), nous proposons une classification clinique du risque de rechute subdivisant les patients en 3 groupes relativement comparables en termes d'effectif. Nous avons ainsi défini un groupe de patient ($n = 62, 32\%$) dits de Haut Risque Clinique (HRC) associé à une CIR à 5 ans de 38% et qui regroupait les patients $NFRP-HR$ avec au minimum un des 2 critères suivants ; une MRD post-induction positive ou un taux de GB $>200 \times 10^9/L$, un groupe de patient de Faible Risque Clinique (FRC) ($n = 58, 31\%$, CIR à 5 ans de 38%) composé des patients gLR avec une MRD négative et un taux de WBC $< 200 \times 10^9/L$ et enfin le reste des patients ($n = 71, 37\%$) qui correspondait au groupe de Risque Intermédiaire Clinique, associé à un CIR à 5 ans de 29% (Figure 25) (Petit et al., 2018).

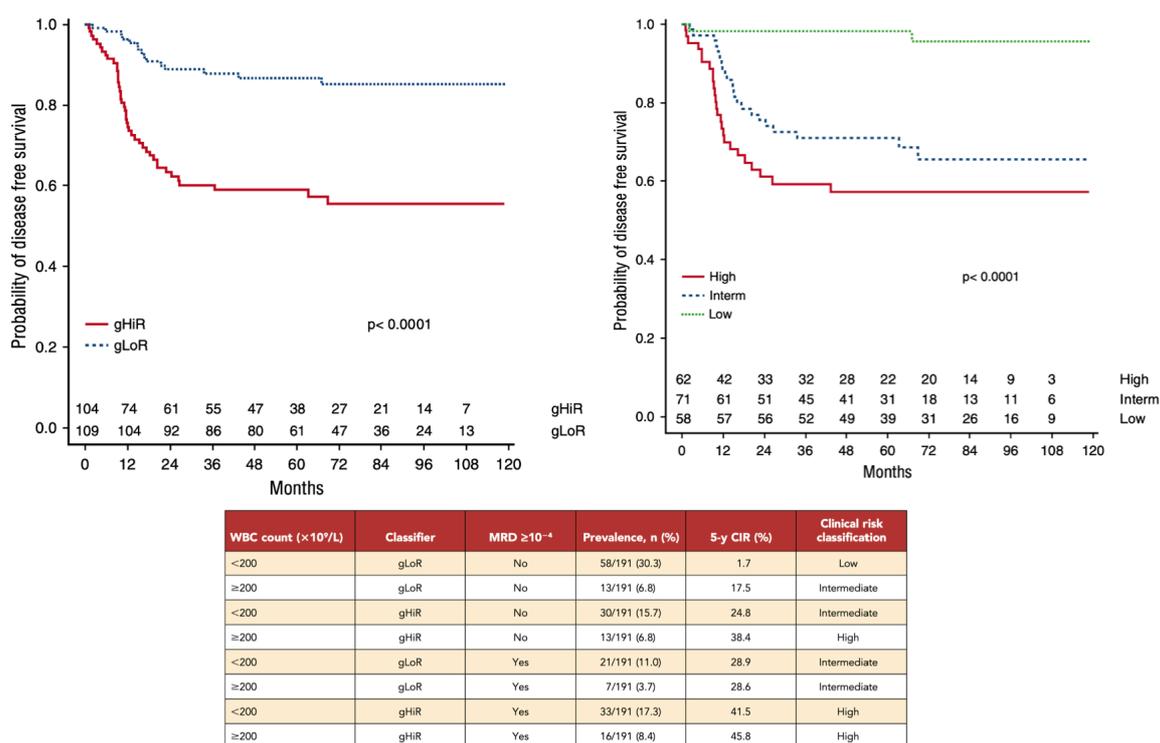


Figure 25 Impact du classifieur $NFRP$ dans la cohorte pédiatrique du FRALLE 2000T et mise en évidence de l'impact du taux de GB et de la MRD en association avec le statut $NFRP$ (Petit et al., 2018).

3. Reproductibilité du classier *NFRP* dans les études internationales

À l'échelle internationale, la valeur pronostique de ce "classier" *N/F/R/P* reste débattue. Il apparaît clair aujourd'hui que les modalités des différents protocoles thérapeutiques sont des facteurs intervenant sur le poids et la significativité de ce-dernier. Les intensités de traitement, le rythme d'administration et la nature même des chimiothérapies diffèrent à travers les différents protocoles. On comprend que ces différences puissent se traduire par une significativité variable du classier à travers les différents protocoles (Figure 26).

Les mutations de *NOTCH1* sont corrélées avec une corticosensibilité accrue, une cinétique de la MRD et un pronostic à long terme favorables dans les protocoles ALL-BFM (Kox et al., 2010). Dans le protocole Britannique UKALL2003, parmi 162 patients pédiatriques, les survies à 5 ans étaient respectivement de 82, 88 et 100% pour les patients *N/F* WT, *NOTCH1*^{Mut} *FBXW7*^{WT} et *N/F* double mutés (Jenkinson et al., 2013). Cependant, parmi les 88 patients adultes traités dans le protocole UKALLXII/E2993 il n'y avait pas d'impact relatif au statut de *N/F* sur le pronostic (Mansour et al., 2009). Dans l'étude GMALL 05/93 et 06/99, parmi les 126 patients adultes, les mutations de *N/F* étaient associés à un pronostic favorable uniquement en cas de faible expression de ERG et BAALC (Baldus et al., 2009). Certaines études ont quant à elles spécifiquement rapporté l'impact péjoratif en lien avec les altérations de *PTEN* (Bandapalli et al., 2013; Gutierrez et al., 2009; Jotta et al., 2010).

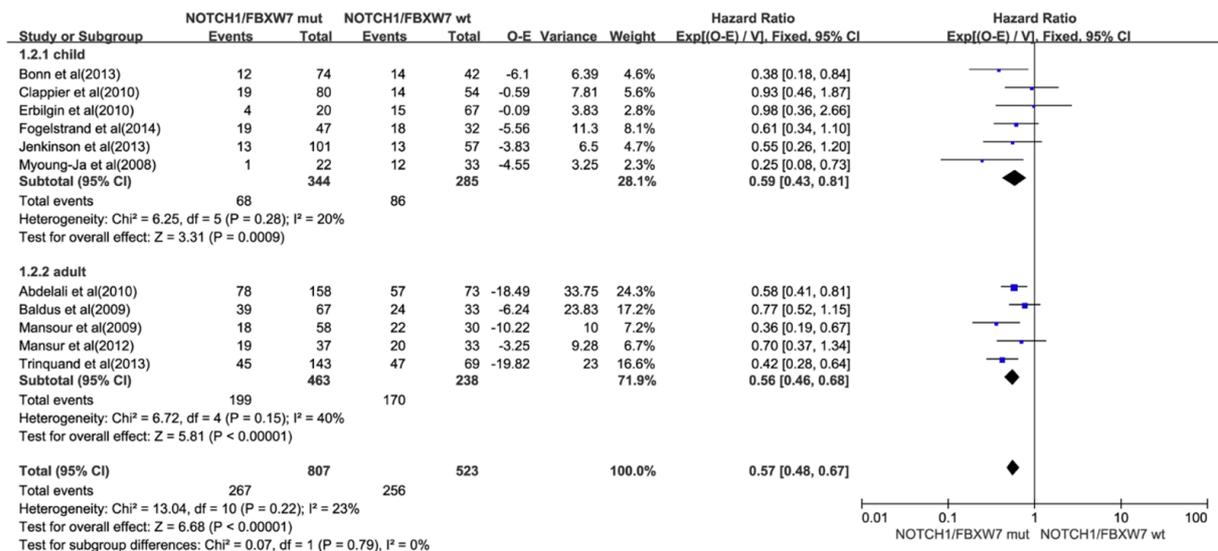


Figure 26 Métaanalyse évaluant l'impact du statut *NOTCH1/FBXW7* dans les différentes études internationales à la fois pédiatriques et adultes (R.-B. Liu et al., 2017)

Concernant le classifieur clinique mis en évidence dans le protocole FRALLE2000T et qui combinait à la fois les paramètres d'oncogénétique (classifieur *NFRP*) et le taux de MRD post-induction ainsi que le taux de GB au diagnostic, son applicabilité dans le protocole UKALL2003 a été testé et cette analyse a révélé d'une part que le protocole UKALL03 était un protocole plus performant que le FRALLE pour les patients atteints d'une LAL-T avec une MRD $>10^{-4}$ et chez les patients *NFRP*-HR avec une MRD négative, probablement en raison des modalités du protocole de chimiothérapie de l'UKALL2003 et en particulier du bras de traitement C réservé aux LAL-T de HR, ce-dernier étant un protocole inspiré du BFM reposant sur une injection continue de chimiothérapie à l'inverse du FRALLE2000-T2 qui reposait plutôt sur la réalisation de blocs de chimiothérapies intensives répétées mais également en raison des indications d'allogreffe, dont le seuil décisionnel fondé sur la MRD différait entre les 2 protocoles. D'autre part, l'UKALL2003 confirmait le pronostic particulièrement favorable des patients combinant à la fois un gLR, une MRD EOI $< 10^{-4}$ et un taux de WBC $< 200 \times 10^9/L$. (Figure 27) (Taj et al., 2022).

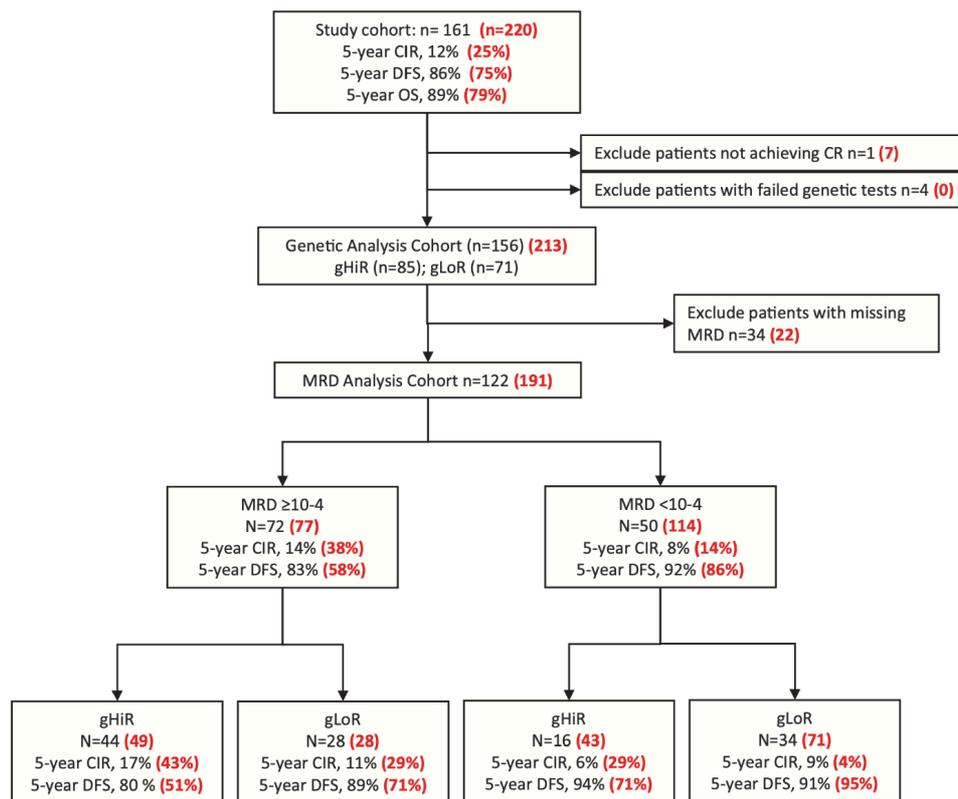


Figure 27 Applicabilité du classifieur *NFRP* et sa combinaison avec la MRD et le taux de GB au diagnostic dans le protocole UKALL03 par rapport au FRALLE2000 (en rouge) (Taj et al., 2022)

b) Identification de nouveaux facteurs pronostiques moléculaires dans les LAL-T

Afin d'établir une nouvelle stratification des LAL-T sur la base de nos résultats de séquençage à haut débit nous avons analysé l'impact pronostique en rapport avec la présence de mutations affectant une centaine de gènes impliqués dans l'oncogenèse T. Notre série d'analyse était composée de 476 patients issus des protocoles pédiatrique FRALLE2000T (n = 261) et adulte GRAALL0305 (n = 215). Ainsi nous avons pu mettre en évidence le pronostic péjoratif associé à la présence des altérations affectant *IKZF1*, *IDH1/2* et *TP53*. A l'inverse certaines altérations semblent associées à un pronostic favorable comme *PTPN2* dans la population pédiatrique. Nous avons ensuite réalisé l'analyse combinée des différentes altérations mise en évidence précédemment. En réalisant une analyse multivariée nous avons sélectionné une série d'altérations dont l'impact pronostique persistait de façon significative. Ainsi nous avons affiné notre précédent classifieur *NFRP* en incluant dans les altérations à haut risque de rechute les altérations d'*IKZF1*, de *TP53*, de *DNMT3A* et les patients présentant une altération de la PI3K au sens large (altérations de *PTEN*, mutations de *PIK3CA* ou de *PIK3R1*). Ce nouveau classifieur permet de redéfinir la classification d'un certain nombre de patients précédemment classés en LR selon le classifieur *NFRP* mais à présent classés en HR-NGS améliorant ainsi la capacité de distinguer dès le diagnostic les patients présentant un risque faible vs un haut risque de rechute sur la base uniquement de leurs altérations mise en évidence par NGS. Afin de dégager un groupe de patients de très haut risque parmi ces patients précédemment classés en HR-NGS nous avons ajouté dans l'analyse les paramètres biologiques ayant précédemment été mis en évidence comme associés à un impact pronostique. Ainsi le statut de la MRD en fin d'induction (seuil à 10^{-4}) et la leucocytose initiale (seuil à $200 \times 10^9/L$) étaient des paramètres qui demeuraient significatifs dans un modèle multivarié après confrontation au NGS-classifieur, et permettaient de sélectionner, au sein des patients HR-NGS, les patients dont le risque de rechute était significativement plus élevé. A l'inverse, l'intégration de ces 2 facteurs dans la sélection des patients LR-NGS nous a conduit à identifier un sous-groupe de patient présentant un très faible risque d'évolution défavorable (VLR).

De la mise en évidence des altérations oncogéniques au développement de nouvelles thérapies ciblées dans les LAL-T

I. La Ferroptose comme nouveau levier thérapeutique dans les LAL-T

1. Généralités sur le concept de Ferroptose

La ferroptose est une forme de mort cellulaire de découverte relativement récente. Sa première description remonte à 2012 par *Dixon et al.* et faisait initialement référence à un mécanisme de mort cellulaire dépendant du contenu intracellulaire en fer et lié à une production de lipides membranaires peroxydés. Sa description initiale remonte à la découverte d'une mort cellulaire induite par l'érastine, un composé dont l'activité anti-tumorale a été mise en évidence dans le cadre d'un criblage réalisé pour identifier des molécules efficaces en cas d'activation de la voie RAS. Les cellules exposées à l'érastine présentaient une diminution de la viabilité sans induction de la perméabilisation des membranes mitochondriales et libération cytosolique de cytochrome-c. Ainsi la ferroptose diffère de l'apoptose et des autres mécanismes de mort cellulaire d'un point morphologique et mécanistique. Ainsi, d'un point de vue morphologique les cellules subissant le processus de ferroptose ne présentent pas les caractéristiques classiques d'apoptose telles que les signes de condensation chromatinienne ou de formation de corps apoptotiques (Friedmann Angeli et al., 2019).

L'accumulation létal de lipides peroxydés est le signe cardinal de la ferroptose et implique un déséquilibre entre les systèmes d'induction et les systèmes d'inhibition de la ferroptose intracellulaire. Ainsi ce processus se produit quand l'activité cellulaire promotrice de substrats impliqués dans la ferroptose dépasse les capacités antioxydantes de la cellule fournies par les systèmes de lutte contre la ferroptose (Figure 28).

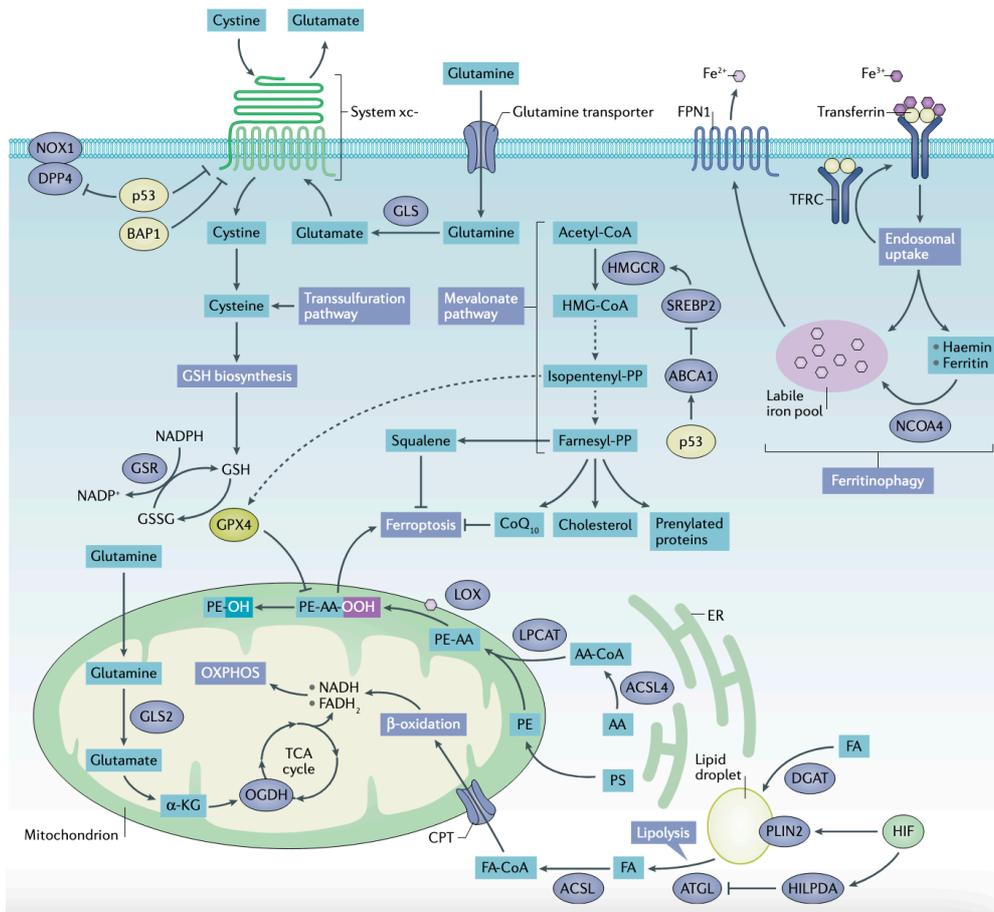


Figure 28 Principaux processus métaboliques impliqués dans la régulation de la ferroptose et de l'activité de GPX4.

Le régulateur central de la ferroptose, GPX4 (*glutathione peroxidase 4*) et les éléments participant à la modulation de son activité sont représentés. On notera qu'il est particulièrement critique d'assurer une concentration optimale en cystine au niveau intracellulaire car il s'agit d'un composant essentiel au cours de la biosynthèse du glutathion (GSH) lui-même indispensable à l'activité de détoxification des lipides peroxydés assurée par la GPX4.

Le processus de mort cellulaire en cas de ferroptose est donc médié par la peroxydation lipidique, un processus dépendant du fer intracellulaire, des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et de phospholipides contenant des chaînes polyinsaturées (PUFA-PLs). Le métabolisme cellulaire peut influencer à la fois le niveau des ROS et des PUFA-PLs. De nombreux facteurs contribuent à moduler la sensibilité à la ferroptose. L'enzyme GPX4 (*glutathione peroxidase 4*) joue un rôle central dans les mécanismes de lutte contre la ferroptose en permettant la réduction des PUFA-PLs oxydés en forme non toxique en utilisant le Glutathion (GSH) comme substrat au cours d'une réaction d'oxydo-réduction. Le taux de GSH est lui-même tributaire du contenu intra-cellulaire en cystéine dont le transport actif dans la cellule est assuré par le système γc qui fonctionne comme un échangeur transmembranaire assurant la rentrée de la cystéine extracellulaire (composée de 2 monomères de cystéine) contre l'export d'une molécule de

Glutamate intra-cellulaire. Le système γc est constitué de 2 sous-unités de *type solute carrier family* reliées par un pont disulfure ; SLC7A11 et SLC3A2(D. S. Liu et al., 2017).

2. Ferroptose et cancer

a) Induction de ferroptose. Une nouvelle piste thérapeutique en oncologie.

La ferroptose pourrait constituer un levier thérapeutique prometteur dans le champ de l'oncologie (Figure 29). Ainsi un nouvel axe de recherche actuellement mené en cancérologie concerne l'identification ou la mise au point d'inducteur de ferroptose (Friedmann Angeli et al., 2019) (Figure 30). Historiquement l'éraستine avait été décrit comme un puissant inducteur de ferroptose mais sans apparaître comme d'une utilité possible en clinique en raison de sa trop grande toxicité.

D'autres molécules ont été explorées et de façon particulièrement intéressante, une d'entre elle vient de démontrer sa capacité à induire la ferroptose, l'APR-246 (ou Epranotop). Il s'agit d'une molécule de synthèse au développement récent et actuellement en cours d'essais dans de nombreuses indications dans le champ de l'oncologie.

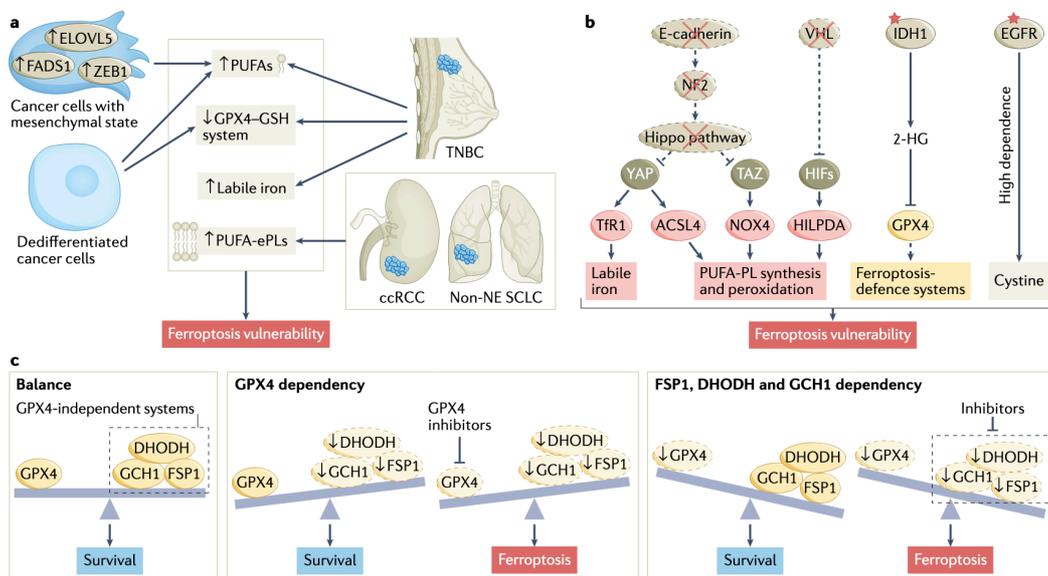


Figure 29 Vulnérabilité à la ferroptose dans les cancers

La ferroptose est un processus de mort cellulaire finement régulé (C), ainsi toutes perturbations affectant les régulateurs qui participent à son équilibre sont susceptibles de faire basculer la cellule dans un processus de mort ferroptose-induit. Certaines cellules cancéreuses possèdent une vulnérabilité à la ferroptose (A), soit car elles se caractérisent par une augmentation de la biosynthèse des PUFA (lipides peroxydés) ou bien car elles présentent une diminution des mécanismes de contrôle des ROS (système GPX4-GSH) ou encore car leur contenu intracellulaire en fer est augmenté ce qui participe à l'induction et au maintien de la ferroptose. Des altérations acquises peuvent également devenir des éléments de susceptibilité à la ferroptose (B). (Lei et al., 2022)

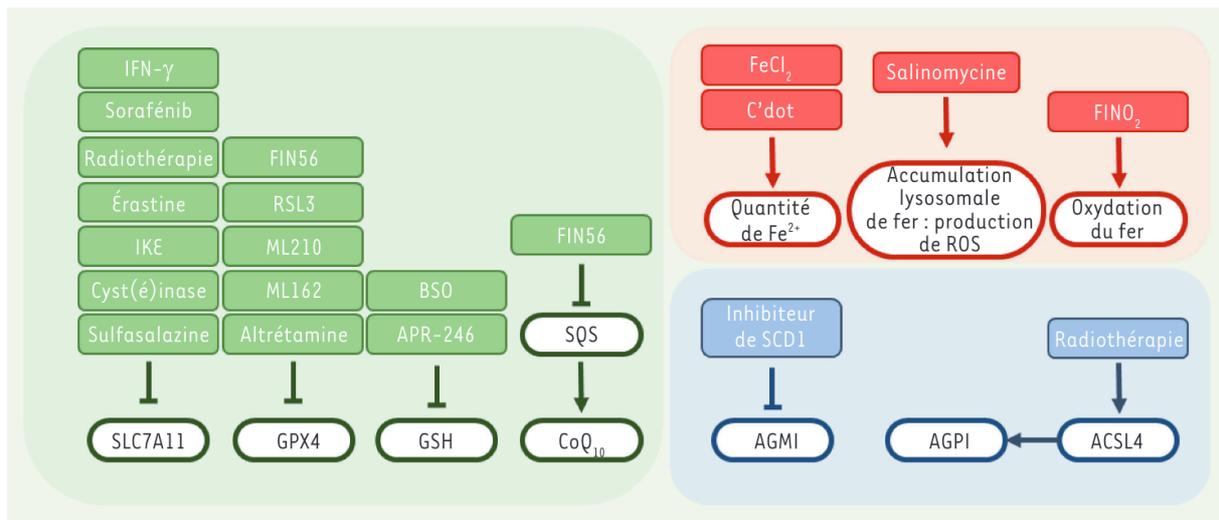


Figure 30 Représentation des principaux inducteurs de Ferroptose et leurs cibles

Les différentes couleurs correspondent aux principales voies de la ferroptose. A noter que certaines de ces thérapeutiques sont déjà utilisées en clinique (Sorafénib, Sulfasalazine, APR-246 et radiothérapie). (Birsén et al., 2021a)

3. APR-246 : développement et mécanismes d'action

a) Généralités sur le développement de l'APR-246

L'APR-246 ou *PRIMA-1^{MET}* est une molécule mise au point récemment et dont le positionnement initial était restreint aux cancers présentant une mutation de *TP53* (Lambert et al., 2009).

En effet, cette molécule est capable de restaurer l'activité physiologique de la protéine p53 en cas de mutation du gène *TP53*. Son mécanisme d'action à l'origine d'une "correction" morphologique de la structure conformationnelle de la protéine p53 mutée a été largement décrit et documentée. En se fixant sur des résidus spécifiques de p53, l'APR-246 corrige la déformation structurelle induite par les mutations de *TP53*. En effet, les mutations de *TP53* sont associées à une modification de la structure protéique, responsables en partie de la perte de l'activité physiologique de tumeur suppresseur de la protéine p53 (Lambert et al., 2009).

Tirant profit de cette capacité à restaurer la fonction des protéines p53 mutées, l'APR-246 a été explorée en premier lieu dans les pathologies connues pour leur forte association avec la présence de mutations de *TP53* (essentiellement des tumeurs matures d'origines épithéliales comme les carcinomes mais également en hématologie dans les syndromes myélodysplasiques et les LAM (Stengel et al., 2017). Ainsi, dans les LAM les mutations de *TP53* sont relativement fréquentes et sont de plus associées à un pronostic péjoratif. Il était donc légitime de tester l'APR 246 dans ce type de pathologies. Deux phases I/II récentes ont étudié l'impact de l'ajout de l'APR-246 à de la 5-azacitidine chez des patients atteints de LAM/SMD et ont montré des

résultats encourageants avec les limites d'essais de phases I/II en termes d'appréciation de l'efficacité (faibles effectifs, suivi médian limité et ne correspondant pas à l'objectif principale de l'étude) (Cluzeau et al., 2021; Sallman et al., 2021).

Si les altérations de *TP53* sont rares dans les LAL-T au diagnostic, celles-ci sont retrouvées avec une fréquence proche de 20% au moment de la rechute et sont, de façon notable, associées à un pronostic péjoratif (Richter-Pechańska et al., 2017). Il n'existe pas de données à ce jour rapportant l'utilisation de l'APR-246 dans les LAL-T. Seul une étude a rapporté l'évaluation de l'activité de l'APR-246 dans les LAL-B, retrouvant une efficacité de cette molécule uniquement restreintes aux patients présentant une mutation de *TP53* (Demir et al., 2020).

b) APR-246 et induction de Ferroptose

En parallèle de son activité de "reformatage" de la protéine p53 mutée, l'APR-246 possède également des propriétés d'induction de ferroptose. Il a ainsi été montré que l'APR-246 réalise des liaisons covalentes avec le GSH conduisant à sa dégradation et donc à la diminution de l'activité détoxifiante de la GPX4 et donc *in fine* à une induction de ferroptose (Figure 31).

Cette propriété d'induction de la ferroptose explique l'activité cytotoxique de l'APR-246 et ce même en l'absence d'altération de p53 dans certains cancers ; myélome, LAM (Birsén et al., 2021b; Tessoulin et al., 2014) et ouvre donc la voie à son utilisation dans un nombre élevé de cancers à condition de pouvoir identifier les déterminants de son efficacité, autrement dit les pathologies pouvant bénéficier d'une modification du seuil de déclenchement du processus de ferroptose.

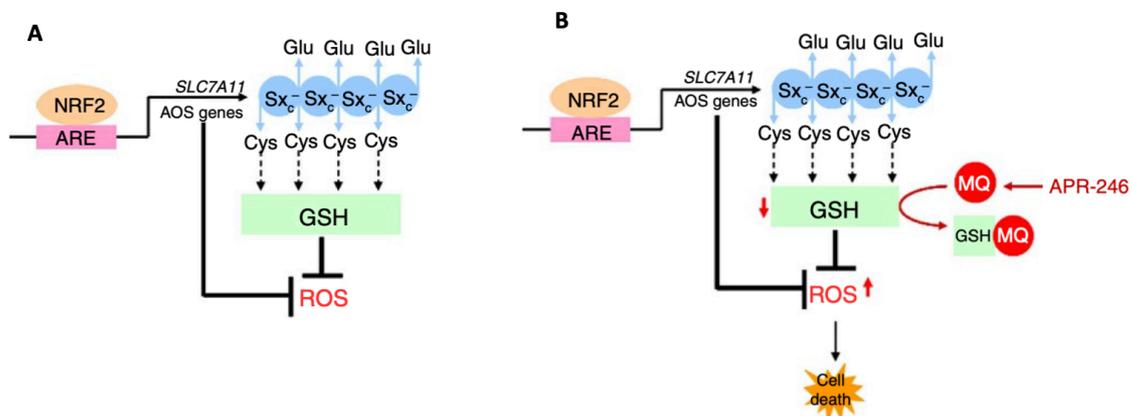


Figure 31 Représentation schématique de la balance GSH/ROS/Ferroptose selon l'absence ou la présence d'APR-246

A l'état d'équilibre, la synthèse de Cystéine via la Cystine (Cys) importée du milieu extracellulaire par le système γ c, va conduire à la biosynthèse de Glutathion (GSH), ce dernier (via l'activité de la GPX4) possède la capacité de réduire les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) en partie produit au cours des processus initiaux de la ferroptose (peroxydation lipidique de la membrane mitochondriale notamment). L'APR-246 (B) est capable de se lier de façon covalente à la GSH ce qui provoque une diminution du contenu en GSH conduisant à déstabiliser l'équilibre Redox intracellulaire, les ROS n'étant plus réduits ils vont exercer leur activité cytotoxique conduisant *in fine* à la destruction de la cellule. Schéma modifié à partir de (D. S. Liu et al., 2017)

4. Conclusion Ferroptose et LAL-T

Nous avons exploré l'efficacité de l'APR-246 dans les LAL-T, d'une part dans un contexte rare de LAL-T *TP53* mutées (au diagnostic et à la rechute) mais étant donné l'activité *TP53*-indépendante de l'APR-246 nous avons également étudié son activité dans les LAL-T *TP53* non mutées afin d'identifier les biomarqueurs impliqués dans la réponse à ce traitement.

II. La voie PI3K/AKT : une nouvelle cible thérapeutique dans les LAL-T

1. Généralités sur la voie PI3K-AKT

La voie PI3K (phosphoinositide-3-kinase)-Akt est une voie dont la dérégulation joue un rôle majeur dans de nombreux cancers (Hoxhaj and Manning, 2020; Thorpe et al., 2015). En condition physiologique cette voie peut être activée en réponse à la stimulation liée à la fixation de l'insuline, aux facteurs de croissances ou en réponse à certaines cytokines. Cette voie régule les processus métaboliques clés dont le métabolisme glucidique, la biosynthèse des macromolécules et le maintien d'une balance redox afin de soutenir à la fois l'homéostasie métabolique et la croissance cellulaire. L'activation oncogénique de la voie PI3K-AKT dans les cellules cancéreuses est responsable d'une reprogrammation du métabolisme cellulaire via l'augmentation de l'activité et de l'expression des transporteurs des substrats métaboliques ainsi que de l'activité enzymatiques des régulateurs, permettant ainsi de soutenir les besoins anaboliques accrus des cellules cancéreuses.

2. Voie PI3K-AKT en condition physiologique

Physiologiquement la voie PI3K/AKT est activée via la fixation d'un facteur de croissance circulant au niveau d'un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase (RTK). Cette activation du RTK conduit à une activation de la PI3K (hétérodimère à activité kinase constituée d'une sous unité régulatrice, p85, et d'une sous-unité catalytique, p110). Le rétrocontrôle négatif de la PI3K est assuré par PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) et certaines phosphatases spécifiques de PI3K. Une fois activée la PI3K phosphoryle un phospholipide membranaire (PIP2) pour synthétiser PIP3 qui fera office de ligand pour assurer la fixation d'AKT à la membrane cellulaire conduisant à sa phosphorylation par PDK1. Une fois activée AKT1 participe à la régulation de ses nombreuses cibles (BAD, GSK3 β , mTOR...)(Hennessy et al., 2005).

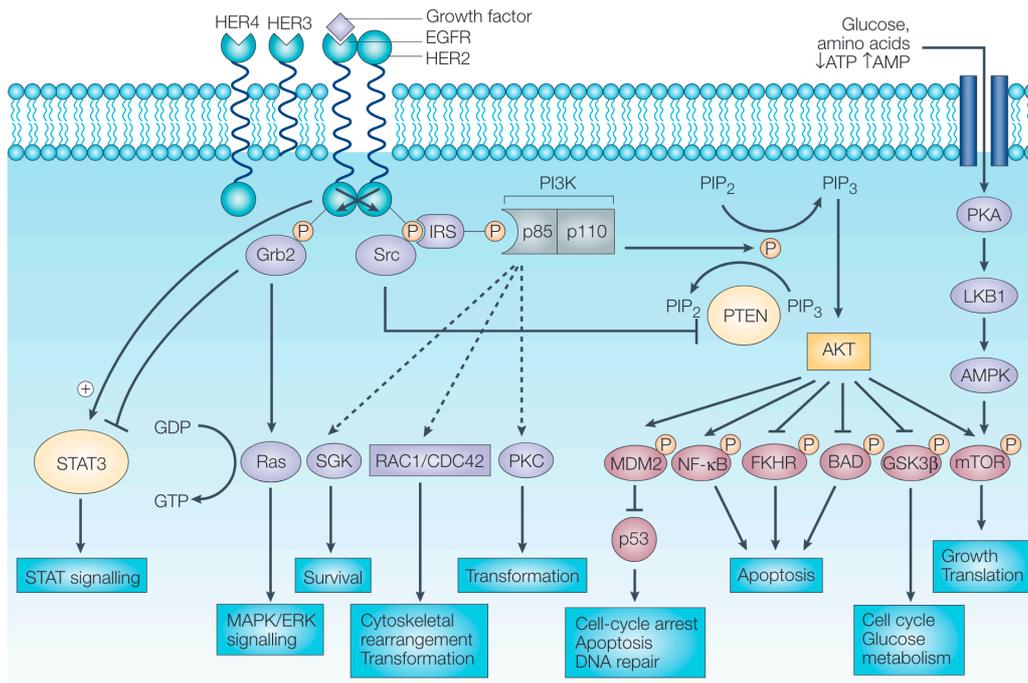


Figure 32 Représentation schématique de la voie PI3K/AKT

3. Conséquences métaboliques liées à l'activation de la voie PI3K/AKT

L'activation d'AKT est responsable de modifications métaboliques importante qui contribue à favoriser un métabolisme de type aérobie via la phosphorylation d'enzymes clé. AKT favorise la localisation membranaire du transporteur du glucose, GLUT1 (*glucose transporter 1*) augmentant ainsi la captation de glucose intracellulaire via l'inhibition de TXNIP, une protéine qui favorise l'endocytose de GLUT1. AKT active également l'enzyme HK2 (hexokinase 2) qui phosphoryle le glucose pour générer du glucose-6-phosphate (glucose-6P), le métabolite qui entre dans la voie des hexosamine, la voie des pentose phosphate et la voie de la glycolyse (**Figure 33**).

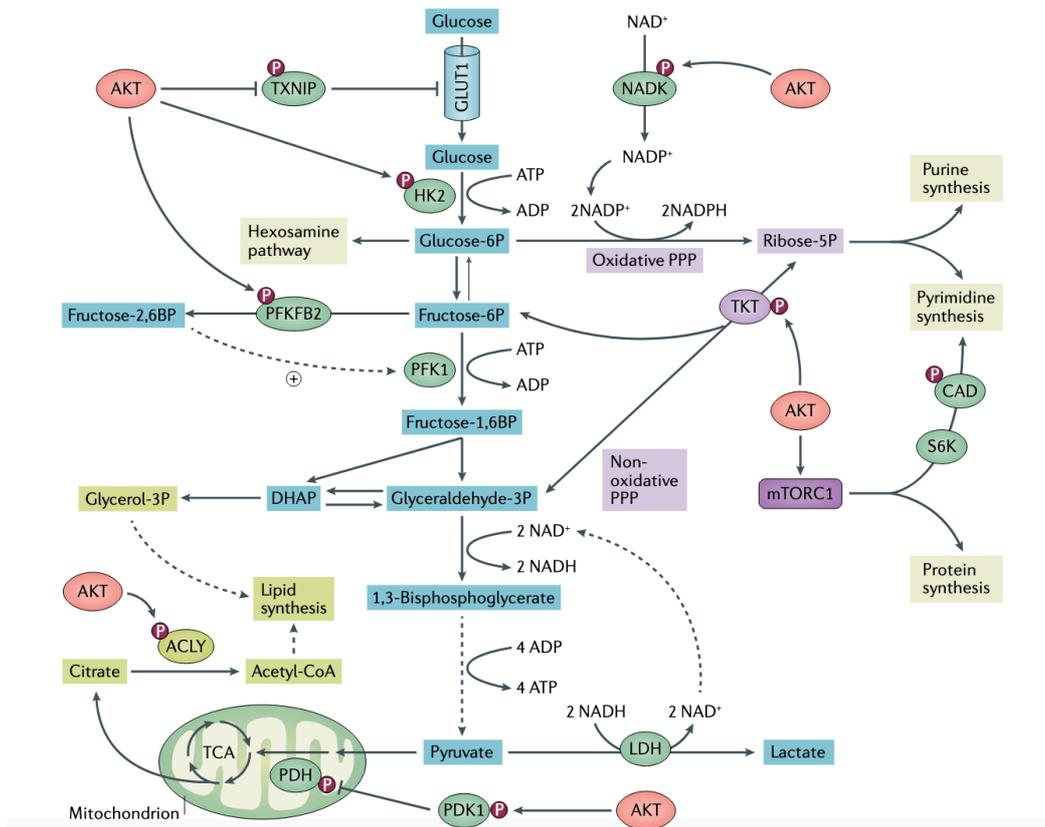


Figure 33 Conséquences métaboliques secondaires à l'activation de la voie PI3K (Hoxhaj and Manning, 2020)

4. Activation de la voie PI3K-AKT dans les LAL-T

Les altérations de la voie PI3K/AKT/mTOR étaient fréquentes dans les LAL-T/LBL-T (environ 20% des cas) (Gutierrez et al., 2009; Lepretre et al., 2016; Petit et al., 2018; Trinquand et al., 2013a) (Erreur ! Source du renvoi introuvable.). De façon notable les altérations de cette voie, responsables d'une activation dérégulée de celle-ci, via les pertes de fonction de PTEN et/ou les mutations gains de fonctions de *PIK3CA*, *PIK3R1* ou *AKT1* sont associées à un pronostic péjoratif dans les hémopathies T Immatures (Gutierrez et al., 2009; Tesio et al., 2017).

D'un point de vue métabolique l'inactivation de PTEN (19% des LAL-T) s'accompagne d'une augmentation du taux de lactate intracellulaire suggérant une up régulation de la glycolyse en cas d'activation dérégulée de la voie PI3K/AKT dans les LAL-T (Herranz et al., 2015).

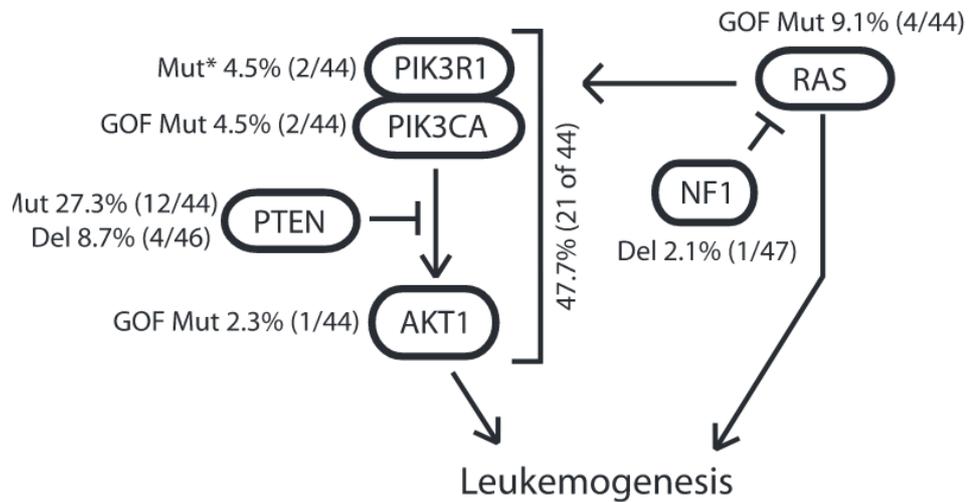


Figure 34 Altérations de la voie PI3K/AKT dans les LAL-T (Gutierrez et al., 2009)

5. Conclusion PI3K et LAL-T

La fréquence élevée des altérations de la PI3K/AKT dans les LAL-T, l'impact pronostique péjoratif associé et l'existence d'inhibiteurs spécifiques disponibles en clinique, tous ces arguments font de cette voie une cible thérapeutique de choix dans les LAL-T. Nous avons donc exploré les conséquences d'une inhibition de la voie PI3K dans les hémopathies T.

III. Identification et ciblage des cellules initiateuses de leucémies dans les LAL-T

1. Le concept de cellules souches cancéreuses (CSCs) en oncologie

Le concept de cellules souches cancéreuses (CSCs) repose sur un principe d'organisation hiérarchique de la population tumorale, qui serait composée d'un ensemble hétérogène de cellules cancéreuses et de l'existence au sein de cette masse ou "bulk tumoral" d'un sous-contingent cellulaire minoritaire présentant des caractéristiques biologiques et fonctionnelles spécifiques leur conférant un statut de CSCs. Ces propriétés biologiques nécessaires pour leur attribuer l'adjectif « souches » ont été clairement exposées par John Dick et son équipe à la fin des années 90 après la mise en évidence, dans un modèle de leucémies aiguës myéloïdes (LAM), d'un contingent de cellules blastiques qui exprimaient le CD34 sans exprimer le CD38 (Lapidot et al., 1994) (Figure 35). John Dick et son équipe ont montré que seules ces cellules CD34+ CD38- étaient capables de générer des nouvelles LAM après réimplantation dans des modèles murins (contrairement aux cellules CD34+CD38+ ou CD34-). Ainsi ces CSCs doivent être capable (1) d'auto-renouvellement (2) de donner naissance à des cellules filles clonal d'un degré de différenciation supérieure et (3) d'être en mesure d'établir un nouveau cancer identique au modèle initial après transplantation dans un organisme receveur adapté.

De façon notable, ces CSCs apparaissent également comme chimio et radio-résistantes contrairement au bulk tumoral, et seraient responsables de la rechute survenant au cours ou à distance du traitement.

La mise en évidence de certains marqueurs spécifiques associés aux CSCs a permis d'isoler les CSCs dans un certain nombre de cancer notamment les LAM mais également dans les tumeurs solides comme les cancers du sein, du colon ou encore du pancréas (Al-Hajj et al., 2003; Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994; Li et al., 2007; Vermeulen et al., 2008).

Cependant, l'individualisation d'une population de CSCs à partir de marqueurs phénotypiques n'a pas pu être étendu au champ des LAL B ou T avec le même succès (Kong et al., 2008; le Viseur et al., 2008; Rehe et al., 2013).

Ainsi, dans le champ des LAL-T, le terme de CSCs a été substitué par celui de TIC ou LIC pour *tumor initiating cell* ou *leukemia initiating cell*, faisant référence à leur capacité de reproduire la leucémie une fois transplantée dans des modèles murins. Le concept de TIC/LIC

doit être considéré comme distinct de celui de *cell-of-origin* (COO) (Visvader, 2011). En effet le concept de TIC/LIC fait référence à des cellules au sein desquelles le processus de tumorigenèse peut être initié alors que la COO correspondrait à la cellule témoin du 1^o hit oncogénique qui aboutirait, au gré des additions successives de nouvelles altérations oncogéniques au fil de l'évolution clonale, à l'émergence d'une prolifération cancéreuse aboutie.

L'acquisition des propriétés de cellules souches pourrait survenir à des stades plus tardifs de la tumorigenèse et concerner des cellules plus évoluées dans leur acquisition d'anomalies oncogéniques que la cellule ayant subi le premier "hit" oncogénique. C'est dans ce sens que John Dick a proposé que les TIC/LICs devaient être définies selon leurs capacités à (1) générer une tumeur dans des modèles de xénogreffes dont les caractéristiques seraient superposables au modèle "parental" issu du patient, (2) continuer à générer des tumeurs dans plusieurs passages de xénogreffes successifs et enfin (3) donner naissance à des cellules filles ayant conservé des capacités de prolifération mais devenues incapables de d'établir des tumeurs après plusieurs passages dans des xénogreffes (Kreso and Dick, 2014).

2. Mise en évidence des LICs dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Comme nous l'avons précédemment abordé, c'est à la fin des années 90 que la présence de LIC a été rapportée pour la première par John Dick et son équipe au sein des LAM (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Cette équipe a donc démontré qu'il existait, au sein du bulk leucémique, un contingent cellulaire minoritaire composé de cellules blastiques CD34⁺CD38⁻, ces cellules, une fois isolées et réinjectées dans un modèle de souris immunodéprimées de phénotype *SCID* (*Severe Combined Immunodeficiency*), étaient capables de générer une nouvelle LAM. De façon remarquable, les cellules CD34⁺ CD38⁺, phénotypiquement plus différenciées, étaient incapables de créer une nouvelle LAM après avoir été injectées dans ces modèles murins. Dans un modèle d'étude murin présentant un état d'immunosuppression supérieur de type *NOD/SCID* (*non-obese diabetic*) les auteurs ont démontré que les cellules CD34⁺CD38⁻ présentaient des capacités d'auto-renouvellement et la possibilité de donner naissance à des cellules différenciées (Bonnet and Dick, 1997). Cette étude démontra pour la 1^o fois l'existence d'une organisation hiérarchique au sein des LAM en plaçant les cellules CD34⁺CD38⁻ au sommet de cette pyramide (Figure 35).

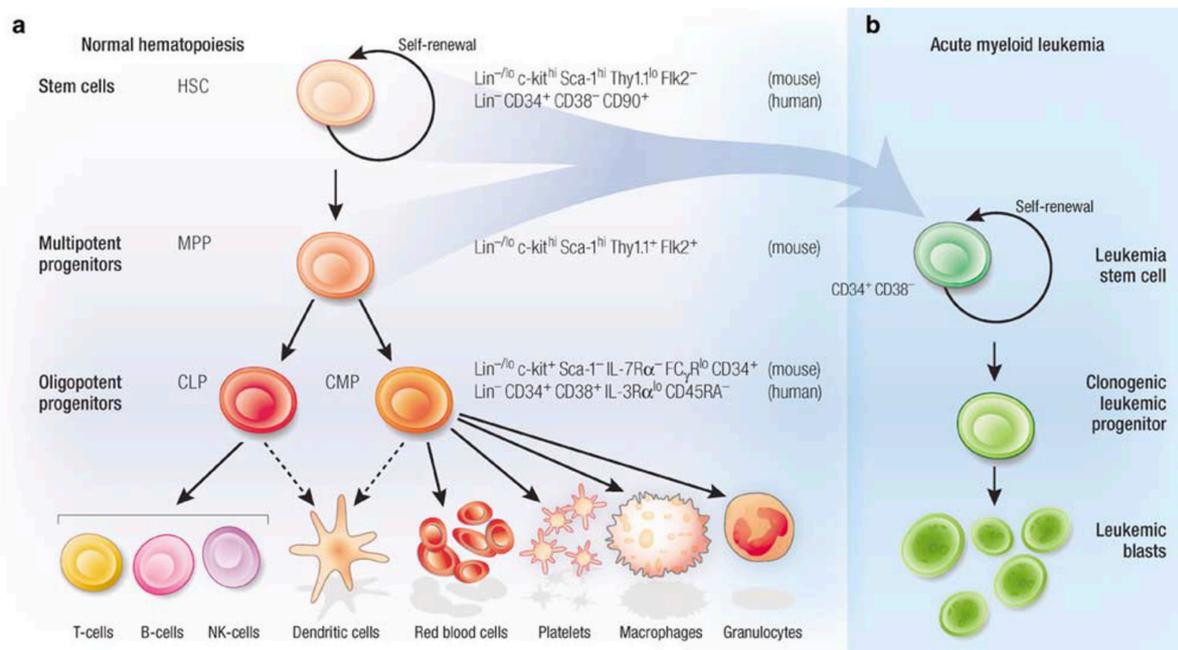


Figure 35 Le modèle de cellules souches cancéreuse selon John Dick

Comparaison de l'hématopoïèse normale (A) et du modèle de cellules souches leucémiques dans les leucémies aiguës myéloïdes issues d'un progéniteur $CD34^{+} CD38^{-}$ (Tan et al., 2006)

Ces résultats ont par la suite été remis en question par certaines études utilisant des modèles murins présentant une immunosuppression encore majorée. Ainsi, dans les souris NSG (*NOD/SCID/IL-2Rgc^{null}*) les LIC de LAM ne semblent plus se limiter qu'au sein du contingent des cellules $CD34^{+}CD38^{-}$ (Sarry et al., 2011) puisque les auteurs en retrouvaient au sein du contingent cellulaire $CD34^{+}CD38^{+}$. Le concept de LIC a également été questionné par une étude au cours de laquelle dans un modèle de lymphome T *RAS* induit et dans un modèle de lymphome B *Eμ-Myc*, les auteurs ont montré que les cellules lymphomateuses étaient capables de greffer dans des animaux non congéniques indépendamment du nombre de cellules injectés (Kelly et al., 2007). Les auteurs soulignent ainsi l'importance d'interpréter les résultats des expériences de transplantations en série en tenant compte du degré d'immunosuppression des modèles car l'échec d'une éventuelle prise de greffe pourrait être lié à l'incapacité des cellules humaines à s'adapter au micro-environnement murin sans forcément être lié à leur propre capacité intrinsèque de générer une nouvelle leucémie.

3. Identification des LIC dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

L'identification des LIC dans les LAL semble beaucoup plus complexe que dans les LAM. A l'heure actuelle, les méthodes d'individualisation des LIC dans les LAL n'ont toujours pas été établis avec un degré de reproductibilité satisfaisant et l'existence même de ces LIC

reste débattue. Les premières études réalisées dans les LAL-B proposaient que le contingent relativement immature des cellules $CD34^+CD19^-$ étaient susceptibles de contenir des LIC (Cox et al., 2009, p. 133, 2004). Cependant, certaines études récentes ont montré que les blastes leucémiques $CD34^+CD19^+$ étaient en mesure d'initier une leucémie dans les LAL-B *ETV6-RUNX1* (Castor et al., 2005). De plus, une étude portant sur les LAL-B avec remaniement *MLL-AF4* a montré que les LIC capables de reconstituer une LAL après transplantation étaient exclusivement $CD19^+$ mais avec une expression de $CD34$ variable (Bardini et al., 2015).

Ces études soulignent l'hétérogénéité phénotypique des LIC dans les LAL-B et suggèrent que les différentes anomalies oncogénétiques pourraient également jouer un rôle dans la modulation des caractéristiques phénotypiques permettant d'identifier ces LIC, complexifiant ainsi la possibilité de standardiser leur individualisation.

De façon similaire, la nature des LIC dans les LAL-T reste particulièrement débattue. Une des toute première étude a suggéré que les blastes $CD34^+CD4^-$ et $CD34^+CD7^-$ présentaient des propriétés de LIC après injection dans modèles murins NOD/SCID (Cox et al., 2007). Une étude explorant l'activité LIC dans les LAL-T corticales/matures a montré que la population $CD34^+CD7^-$ de ces patients contenait des cellules hématopoïétiques normales capables de se différencier en différentes lignées alors que le contingent cellulaire $CD34^+CD7^+$ possédait des capacités de LIC (Gerby et al., 2011). Dick et Chi et al. ont également rapporté que les blastes $CD7^+CD1a^-$ étaient enrichis en LIC et possédaient des capacités de résistances accrues aux corticoïdes (Chiu et al., 2010).

4. Caractérisation fonctionnelle des LIC dans les LAL.

Dans un travail publié en 2016, Ebinger et al. ont abordé la question des LIC dans les LAL d'une façon particulièrement pertinente et novatrice. En partant du postulat selon lequel l'identification des LIC sur les seuls marqueurs de différenciation ne pouvait constituer une méthode suffisamment robuste pour les isoler dans un contexte de LAL, les auteurs se sont basés sur le principe de quiescence inhérente au statut de LIC pour séparer les LIC du reste du bulk leucémique. Ce statut de quiescence était défini par une absence de dilution d'un marqueur intracellulaire, le CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) dont le contenu intracellulaire diminuait proportionnellement à chaque division cellulaire. Ainsi au bout d'un certain temps d'observation, les auteurs étaient en mesure de différencier les cellules blastiques s'étant divisées (c'est-à-dire celle dont l'intensité du marquage en CFSE avait diminué) des cellules ne

s'étant pas ou peu divisées (autrement dit les cellules qui conservaient la même intensité de marquage en CFSE entre le début et la fin de l'observation).

En triant puis en étudiant spécifiquement ces cellules qui conservaient ou "retenaient" le marqueur de division (d'où le terme de LRC pour *Label Retaining Cell*) les auteurs ont contribué à enrichir les connaissances dans le domaine des LIC des LAL (Figure 36) en proposant une approche fonctionnelle d'identification de ces-dernières.

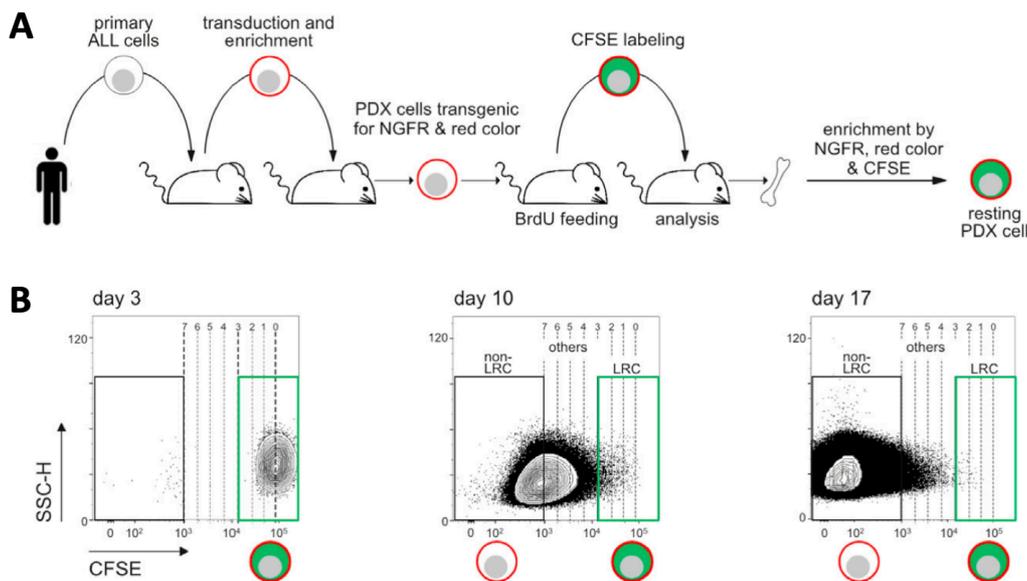


Figure 36 Principe du marquage par CFSE des blastes de LAL et suivi de la prolifération pour sélectionner la population LRC (*label retaining cell*)

(A) Procédure expérimentale de réinjection des cellules primaires de LAL après manipulation transgénique et marquage au CFSE. (B) Stratégie de « gating » définissant les LRC (*label retaining cell*), les non-LRC et le reste des blastes, 3 jours post-injection des cellules marquées au CFSE. L'intensité de marquage du CFSE au moment des évaluations successives (à J10 et J17) est inversement proportionnelle au nombre de division cellulaire. Le gating réalisé à J3 permet de subdiviser les cellules en 3 groupes à J17, ainsi sont considérées comme LRC les cellules qui ont conservé une intensité de marquage équivalente au marquage initial réalisé à J3, comme non-LRC les cellules dont l'intensité de marquage a diminué au minimum d'un log et le reste des blastes présentant un statut intermédiaire. (Ebinger et al., 2016)

Dans ce travail les auteurs ont montré de façon robuste que ces LRC étaient douées de propriétés caractérisant les LIC ; elles étaient notamment capables de recréer une LAL après injection dans des modèles murins immunodéprimés (Figure 37). Par ailleurs, certains éléments suggéraient fortement que ces LRC/LIC appartenaient, au moins en partie, au contingent de cellules blastiques à l'origine de la rechute dans les LAL. Ainsi, ces cellules présentaient une chimiorésistance accrue (Figure 38), et présentaient un profil d'expression transcriptomique distinct des cellules non-LRC (Figure 39) mais de façon remarquable, superposable aux cellules blastiques du contingent de cellules leucémiques résiduelles isolées en cas de MRD positive chez des patients traités en condition réelle (Figure 40).

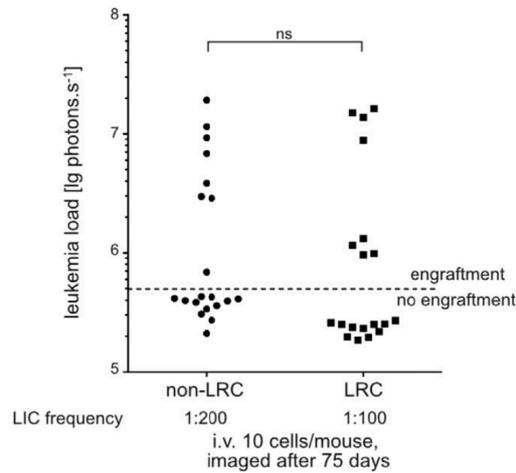


Figure 37 Épreuves de retransplantations des LRC et des non-LRC dans des modèles murins.

Après sélection des LRC et des non-LRC, ces cellules sont réinjectées dans des souris NSG (10 cellules/souris). On constate que les non-LRC sont capables de greffer avec un niveau équivalent de prise de greffe à celui des LRC. De façon surprenante, le taux de LIC au sein des non-LRC après la prise de greffe était également équivalente entre les 2 populations cellulaires. Au total, les non-LRC présentent également des propriétés d'initiation de leucémie mais l'expression de ces capacités semblent réversibles ou inducibles selon le contexte, renforçant ainsi le concept de plasticité des LIC dans les LAL. (Ebinger et al., 2016)

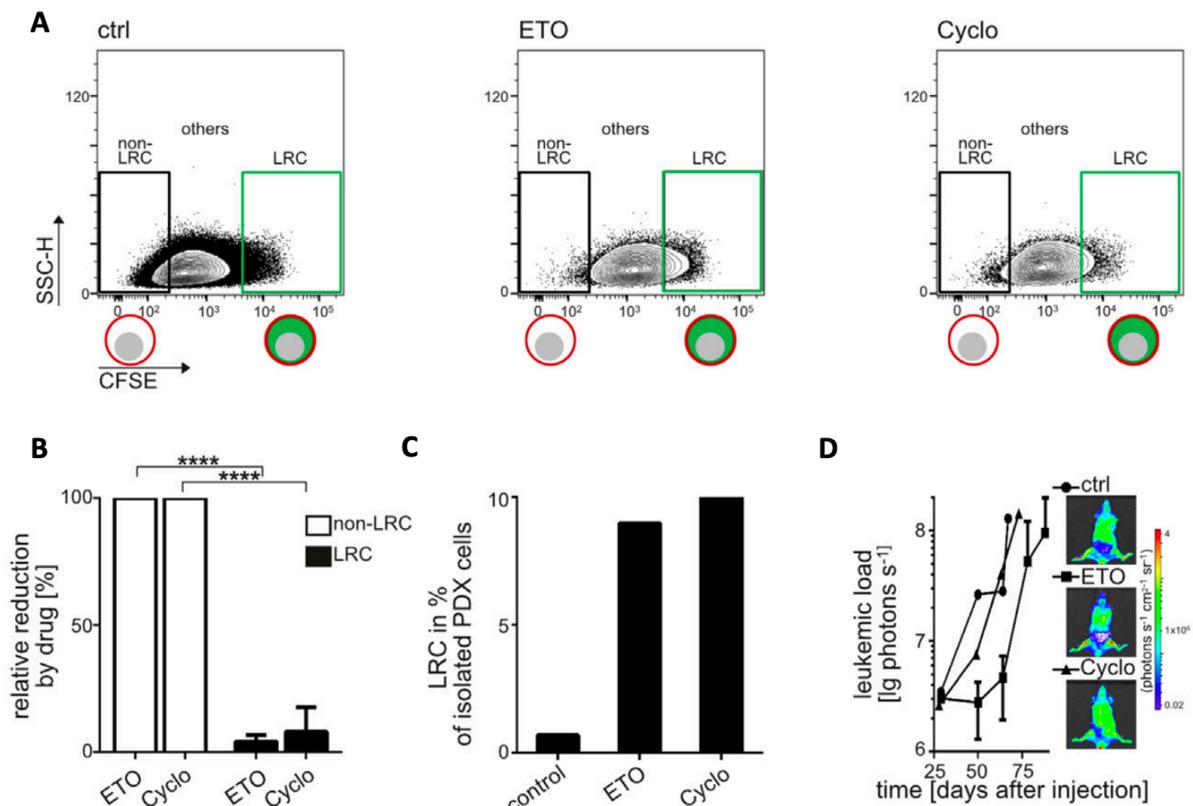


Figure 38 Chimiorésistance des LRC dans les LAL

(A) Après avoir traité des PDX de LAL avec de la chimiothérapie pendant 7 jours (Etoposide (ETO) ou Cyclophosphamide (Cyclo)) l'analyse des LRC/non-LRC suivant l'intensité de marquage au CFSE révèle que la chimiothérapie conduit à une éradication de la quasi-totalité alors que les LRC, bien que leur valeur absolue diminue après l'exposition à la chimiothérapie, leur ratio (LRC/non-LRC) est largement augmenté (B-C). Ainsi, la chimiothérapie semble sélectionner les LRC probablement en lien avec leur propriétés intrinsèques de quiescence les rendant résistantes à l'action des drogues anti-prolifératives. Ces LRC sélectionnées après exposition à la chimiothérapie conservent également leur capacité de LIC (D). (Ebinger et al., 2016)

Cependant, de façon surprenante, les auteurs ont également montré que les cellules du pool non LRC, autrement dit les cellules qui s'étaient divisées au cours du temps, ces cellules étaient elles aussi capable de récréer la leucémie après transplantation (Figure 37).

Ainsi, Ebinger et al. ont montré que le concept de LIC dans les LAL est un modèle complexe où la capacité de LIC n'est pas dévolue à une population strictement restreinte par certaines caractéristiques définies à un temps t donné. Au contraire il semble s'agit d'une propriété réversible et labile. Les choses se passent comme si les cellules blastiques du bulk leucémique et les cellules quiescentes pouvaient acquérir chacune à un moment donné de la maladie les caractéristiques de l'autre contingent cellulaire témoignant ainsi de leur grande plasticité fonctionnelle (Figure 41). Ces résultats expliquent la difficulté rencontrée jusqu'ici dans le parcours d'identification d'une population souche individualisable de LIC dans les LAL.

Il est important de noter que cette étude portait quasi-exclusivement sur des échantillons de LAL-B. Seuls 2 prélèvements de LAL-T ont été *poolés* dans l'analyse globale et nous ne pouvons pas savoir si les résultats obtenus pour les LAL-B étaient également confirmés dans les LAL-T. (Ebinger et al., 2016)

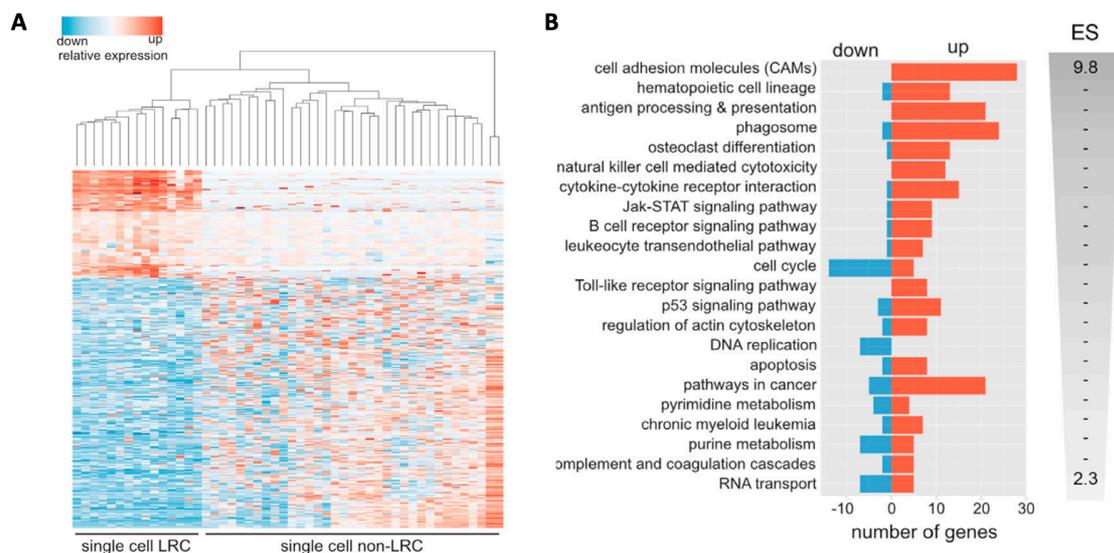


Figure 39 Analyse transcriptomique à l'échelle unicellulaire des LRC vs non-LRC

(A) Clustering hiérarchique et représentation en heatmap de l'expression génique des 500 gènes différemment exprimés entre les LRC et les non-LRC réalisés sur 50 cellules en scRNAseq. **(B)** Les gènes fortement exprimés dans les LRC sont impliqués dans les processus de quiescence et de « homing » alors que les gènes impliqués dans le cycle cellulaire et les processus de réplication de l'ADN ont une expression diminuée (en comparaison avec les non-LRC).

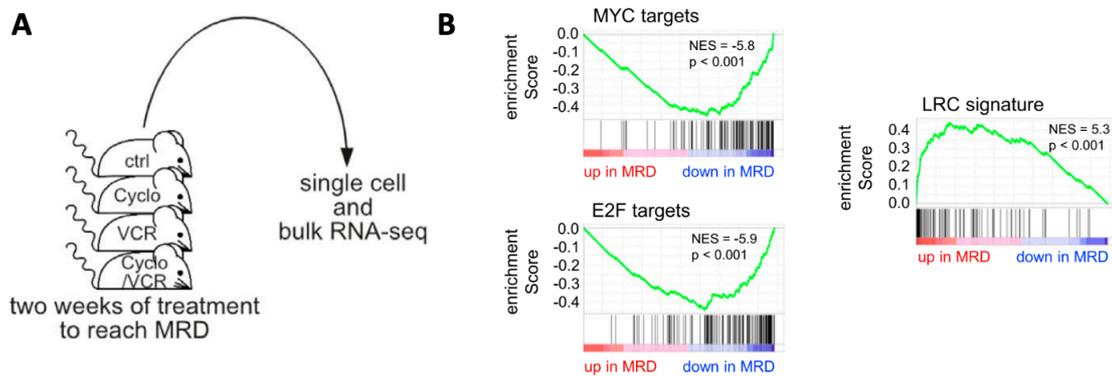


Figure 40 Les LRC partagent de nombreuses similitudes avec les blastes de MRD

(A) Après injection de 10^7 blastes de LAL et l'acquisition d'un envahissement médullaire proche de 30%, les souris étaient traitées par la chimiothérapie pendant 2 semaines afin de se mettre en situation de maladie résiduelle (MRD) avec un taux d'infiltration $< 1\%$. (B) Une analyse transcriptomique était ensuite réalisée sur ces cellules et révélait une *downrégulation* de la voie MYC et E2F avec en revanche une *uprégulation* de la signature LRC précédemment définie.

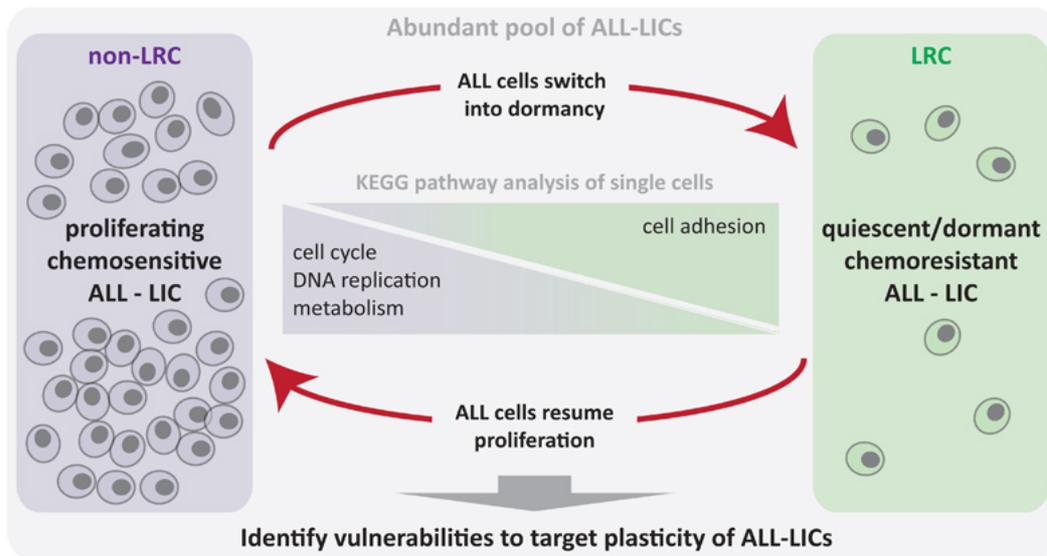


Figure 41 Plasticité des LIC dans les LAL

L'identification de "label-retaining cells" (LRC) dans les LAL révèle que les cellules initiatrices de la leucémie ou *leukemia initiating cells* (LIC) présentent une plasticité fonctionnelle expliquant leur existence dans 2 états distinct au sein de la niche hématopoïétique (i) un état prolifératif, chimiosensible et (ii) un état quiescent, chimiorésistant. Les études de single cell RNAseq (scRNAseq) ont démontré que la population de LRC identifiée dans les LAL présente un état de quiescence avec une *uprégulation* des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire renforçant notamment l'hypothèse selon laquelle le microenvironnement pourrait influencer le phénotype de quiescence (Senft and Jeremias, 2019).

5. Impact de NOTCH1 sur les cellules initiatrices de leucémies (LIC)

Armstrong et al. ont montré en 2009 via des expériences de transplantations en série dans des modèle murins *NOD-SCID* que le phénotype LIC des blastes étaient sélectivement relié à l'activation de NOTCH1 en montrant notamment que cette propriété de LIC était abolie en cas de traitement par inhibiteur de γ sécrétase (Armstrong et al., 2009).

En 2014, Gerbey et al. ont montré que NOTCH1 favorisait l'auto-renouvellement des thymocytes issues des modèles murins de leucémies *Tall/Lmo1* via ses cibles *Hes1* et surtout *Myc*. (Gerbey et al., 2014). Le traitement de cellules blastiques en pré-transplantation par un inhibiteur de γ sécrétase abolissait totalement les capacités de LIC des cellules blastiques.

En 2018, Garcia et al. ont précisé le rôle de NOTCH1 dans la modulation de l'activité des LIC en montrant que la molécule d'adhésion CD44 impliquée dans le homing des LIC au niveau de la niche hématopoïétique était une des cibles de NOTCH1 (García-Peydró et al., 2018, p. 44). En partant du constat que l'activation de NOTCH1 seule n'était pas suffisante pour générer une LAL-T mais conduisait à l'accumulation de cellules pré-leucémiques à un stade DP, les auteurs ont cherché à identifier les événements additionnels précoces qui pourraient conduire à l'émergence d'un clone doué de capacités oncogéniques suffisantes pour générer une LAL-T. Parmi ces éléments précoces ils ont mis en évidence que l'activation supra physiologique de CD44 dans des thymocytes DP *NOTCH1^{Mut}* conduisait à l'émergence d'une LAL-T *in vivo* avec de façon notable une dissémination extra-thymique de la leucémie et une infiltration médullaire massive (García-Peydró et al., 2018, p. 44).

Plus récemment, Piya et al ont précisé le rôle de l'axe NOTCH-MYC-CD44 dans le maintien du phénotype des LIC dans les LAL-T (Piya et al., 2022) en montrant notamment que CD44 participe également à maintenir une balance RedOx optimale au sein de la population LIC (ROS diminués). D'un point de vue thérapeutique, les auteurs montrent que la perturbation de cet axe permettait de réduire drastiquement le taux de LIC dans les LAL-T *NOTCH1^{Mut}*, en utilisant par exemple des inhibiteurs de BRD4, lui-même étant un régulateur de l'expression de NOTCH1-MYC et CD44.

6. Interplay NOTCH1 et MYC dans les LAL-T

a) Généralité sur l'oncogène MYC

L'oncogène *MYC* code pour un facteur de transcription de type bHLH (*basic helix-loop-helix*) dont l'activité régulatrice est centrale en cancérologie. Ce facteur de transcription est impliqué dans la régulation d'un très grand nombre de processus physiologiques incluant le métabolisme cellulaire, la biosynthèse ribosomale et la réplication de l'ADN (Coller et al., 2000; Dang et al., 2006; Guo et al., 2000; Neiman et al., 2001). *MYC* régule transcriptionnellement l'expression de facteurs impliqués dans la biosynthèse des macromolécules nécessaires à l'initiation et au maintien de la croissance cellulaire. Sur le plan métabolique, *MYC* régule la

glycolyse, la glutaminolyse, la synthèse mitochondriale et la production d'énergie intracellulaire (Lee and Dang, 2006; Morrish et al., 2008) (Figure 42).

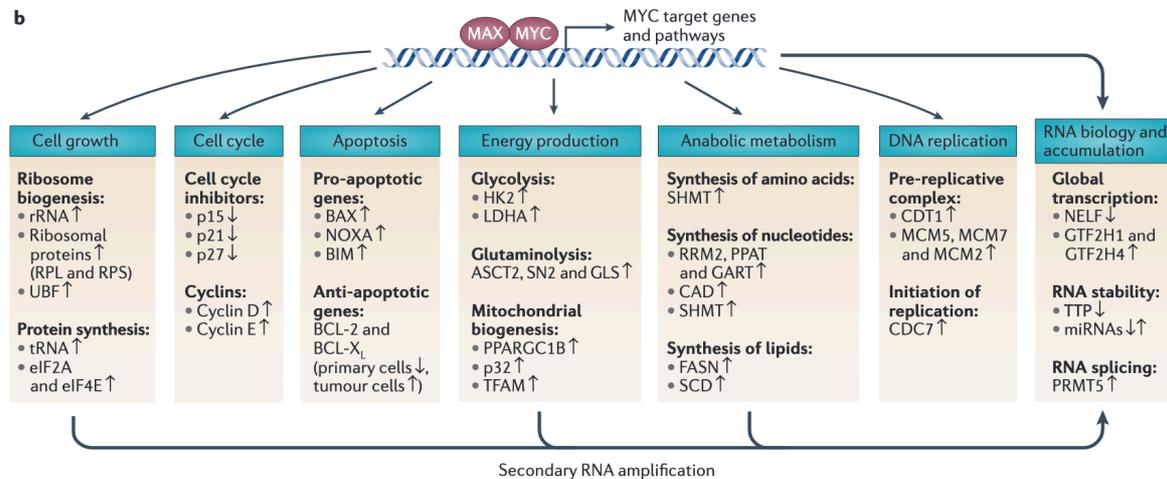


Figure 42 MYC possède une position centrale dans les régulateurs des réseaux oncologiques

Le proto-oncogène MYC est un régulateur clé impliqué dans de nombreux processus oncogéniques. Via ses nombreux gènes cibles (plus de 1570 identifiés) il module l'expression d'un grand nombre de voies métaboliques mais il participe également aux mécanismes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. (Kress et al., 2015)

b) Rôle de MYC dans l'oncogénèse T : Interconnexion entre NOTCH1 et MYC

Historiquement le lien entre les LAL-T et MYC a été mis en évidence par la découverte d'une translocation t(8;14)(q24;q11), rare mais récurrente qui induit une surexpression de c-MYC en le plaçant sous la dépendance de *T-cell specific enhancer element* situés à proximité du TCRA/TCRD. De plus la voie de signalisation de NOTCH1 se comporte comme un régulateur positif de c-MYC. A noter également que la protéine c-MYC a une durée de vie très courte et FBXW7, l'E3 ligase de NOTCH1, est également l'E3 ligase de c-MYC, renforçant ainsi l'interconnexion entre l'activation de NOTCH1 et celle de c-MYC dans les LAL-T.

NOTCH1 et c-MYC sont donc étroitement liés dans le processus d'oncogénèse T. Ces 2 oncogènes fonctionnent de concert dans un circuit d'entraînement positif, NOTCH1 active directement l'expression de MYC et les 2 protéines présentent des cibles transcriptionnelles communes impliqués notamment dans les phénomènes de croissances cellulaires (Margolin et al., 2009; Palomero et al., 2006). Des études précédentes ont également rapporté que l'inhibition de NOTCH1 induisait une diminution de l'expression de MYC dans LAL-T et que d'autre part NOTCH1 était en mesure de se fixer sur des régions régulatrices situées au niveau du promoteur de MYC (Palomero et al., 2006; Sharma et al., 2006; Weng et al., 2006). De plus, l'analyse combinée des gènes cibles de c-MYC et de NOTCH1 a montré que c-MYC était en mesure de se fixer sur des régions promotrices en principe régulées par NOTCH1 (Margolin et al., 2009).

Par ailleurs, l'expression induite de MYC est en mesure de reverser l'effet de l'inhibition de l'activité de NOTCH1 (induite par l'utilisation d'un inhibiteur de γ sécrétase) sur la croissance cellulaire dans un certain nombre de lignées cellulaires de LAL-T (Palomero et al., 2006; Sharma et al., 2006; Weng et al., 2006).

Dans ce contexte il est intéressant de noter que les LAL-T présentant une translocation de MYC sont toujours N/F^{WT} (Gianfelici et al., 2016). De plus, les modèles animaux de LAL-T avec une activation de *Myc* par le biais d'une translocation, tels que les modèles induits par la perte de *Pten* ou l'activation de la β *catenin*, ne présente pas d'activation de la voie Notch1. Ces données supportent donc une probable redondance fonctionnelle entre NOTCH1 et MYC dans les LAL-T. A noter cependant que la démonstration directe de l'action de NOTCH1 sur MYC reste difficile à prouver, ainsi les formes actives de NOTCH1 ne sont pas en mesure d'activer le promoteur de MYC dans un contexte de *reporter assays*, ce qui suggère probablement un mécanisme de régulation à longue distance.

Dans les LAL-T, le lien spécifique entre l'activation de NOTCH1 et l'expression de MYC a été confirmé par la mise en évidence d'un *enhancer* situé en position distal du gène MYC et spécifique des cellules T et lui-même contrôlé par NOTCH1. Ce domaine hautement conservé au cours de l'évolution appelé « NMe » pour *NOTCH MYC Enhancer* est fortement occupé par NOTCH1 dans les LAL-T (Geimer Le Lay et al., 2014; Herranz et al., 2014; Yashiro-Ohtani et al., 2014).

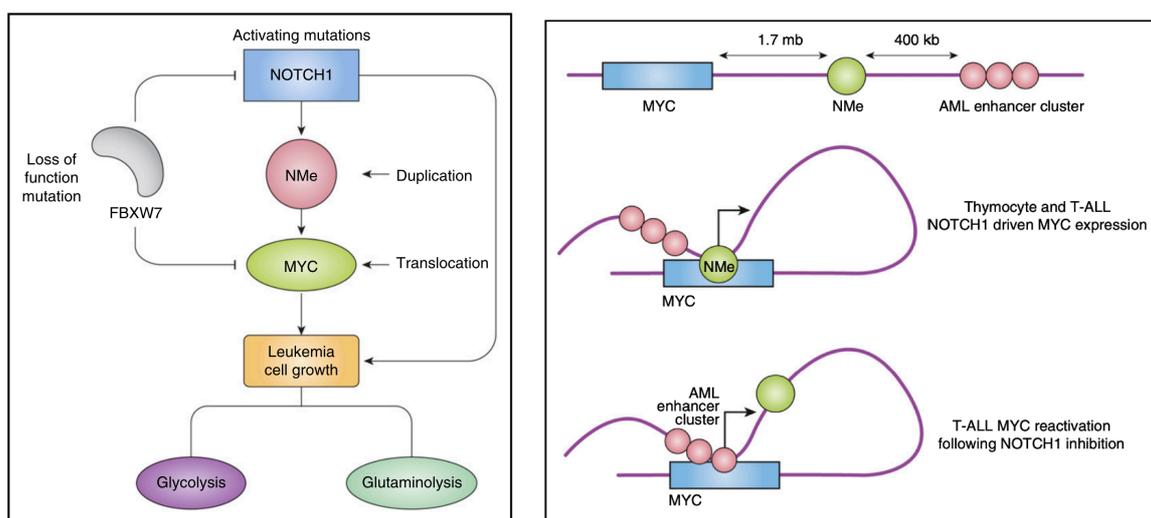


Figure 43 Interconnexion entre NOTCH1 et MYC dans les LAL-T

L'activation de la voie NOTCH1 dans les LAL-T est majoritairement liée à la présence de mutation activatrices de *NOTCH1* et/ou la perte de fonction de *FBXW7*. NOTCH1 est un régulateur positif de l'expression de c-MYC via NMe, un enhancer sous la dépendance de NOTCH1 et retrouvé dupliqué dans environ 5% des LAL-T. Les translocations chromosomiques impliquant MYC peuvent également être retrouvés dans 1% des LAL-T et les pertes de fonction de *FBXW7* contribuent également à réguler positivement l'activation de MYC en stabilisant la protéine MYC (*FBXW7* est également l'E3 ligase assurant l'ubiquitylation de MYC en vue de sa dégradation protéosomale). NOTCH1 et MYC possèdent des cibles transcriptionnelles communes à

l'origine d'une boucle de rétrocontrôle positive ayant pour conséquence une augmentation de la croissance cellulaires, de la prolifération et une majoration de propriétés d'auto-renouvellement. (Sanchez-Martin and Ferrando, 2017).

NME interagit directement avec les régions proximales régulatrices de MYC pour former une boucle chromatinienne. L'analyse du développement leucémique dans un contexte murin avec KO de NMe a permis de comprendre l'importance de cette région régulatrice dans l'oncogenèse T NOTCH1-médiée (Herranz and Ferrando, 2015). Ainsi, les souris NME $^{-/-}$ ne peuvent pas générer de leucémie sous l'action d'une expression constitutive de NOTCH1 (Herranz et al., 2014). Par ailleurs, la perte d'une seule copie de NME était suffisante pour induire une diminution de la pénétrance de la leucémie dans ce modèle de leucémie. De la même façon, la délétion de NMe dans un contexte de LAL-T NOTCH1-induite préétablie dans la souris est responsable d'une diminution importante de l'expression de MYC, une abrogation du programme transcriptionnel MYC-induit et d'une altération des capacités de prolifération et de progression tumorale avec également une diminution de l'activité LIC. A noter également que 5% environ des LAL-T présentent une duplication focale de l'enhancer NMe, soulignant son rôle dans le développement oncogénique T (Herranz et al., 2014).

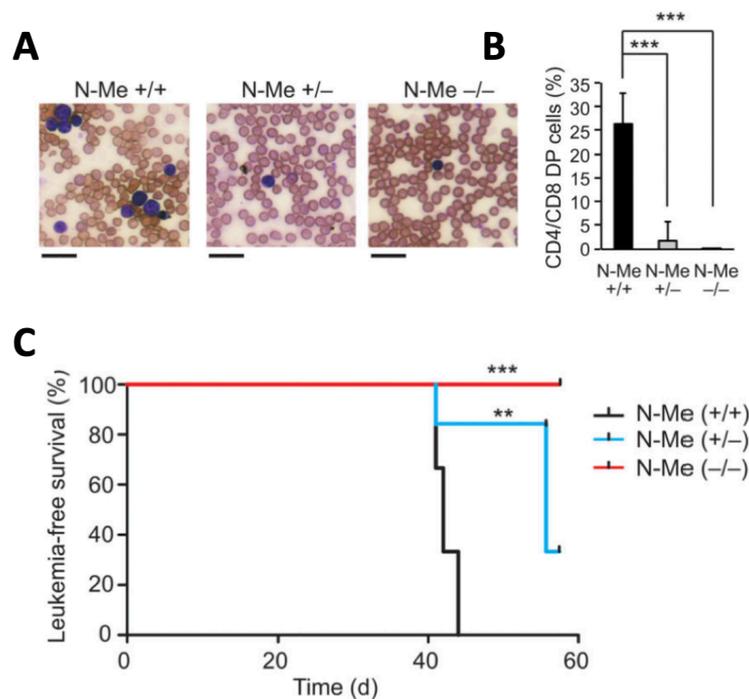


Figure 44 Analyse des conséquences d'un KO de NMe dans un modèle de leucémie ΔE -NOTCH1

(A) Frottis sanguin dans les 3 conditions suivantes ΔE -NOTCH1 NMe +/+, ΔE -NOTCH1 NMe +/- et ΔE -NOTCH1 NMe -/-. Le KO de NMe s'accompagne d'une diminution de la prolifération blastique **(A,B)** et d'une augmentation de la survie des souris ΔE -NOTCH1 NMe +/- et ΔE -NOTCH1 NMe -/- comparativement au souris ΔE -NOTCH1 NMe +/+ (6 souris par condition) **(C)**. (Herranz et al., 2014)

c) Modulation de l'activité de NOTCH1/MYC sous pression de la chimiothérapie.

Étant donné le rôle majeur de la voie NOTCH1-cMYC au cours de l'oncogenèse T, on comprend que les pistes thérapeutiques envisagées actuellement se concentrent sur l'objectif de cibler cette voie en vue de l'inhiber (inhibiteur de NOTCH1 via le recours à des inhibiteurs de γ secretase) (Habets et al., 2019). Les limites inhérentes à ces approches d'inhibition de NOTCH1/MYC reposent sur le fait que l'utilisation de ces traitements ne prennent pas en compte le contexte d'exposition à la chimiothérapie et les conséquences en lien avec le statut NOTCH1/MYC et la sensibilité à la chimiothérapie.

Harrington et al ont récemment montré que l'activité pro-proliférative induite par c-Myc pouvait constituer un levier thérapeutique en situation d'exposition à la chimiothérapie (Harrington et al., 2019). Les auteurs ont ainsi rapporté dans un modèle de lymphome B *Myc-drivé* qu'une stabilisation de de MYC permettait d'augmenter la sensibilité aux drogues dont l'activité était dépendante du cycle cellulaire comme la doxorubicine. L'inhibition de la GSK-3 β (régulateur négatif de c-MYC) avec un inhibiteur spécifique (CHIR99021) augmentait de façon significative la sensibilité des lignées de lymphome B (RAMOS) (Figure 45).

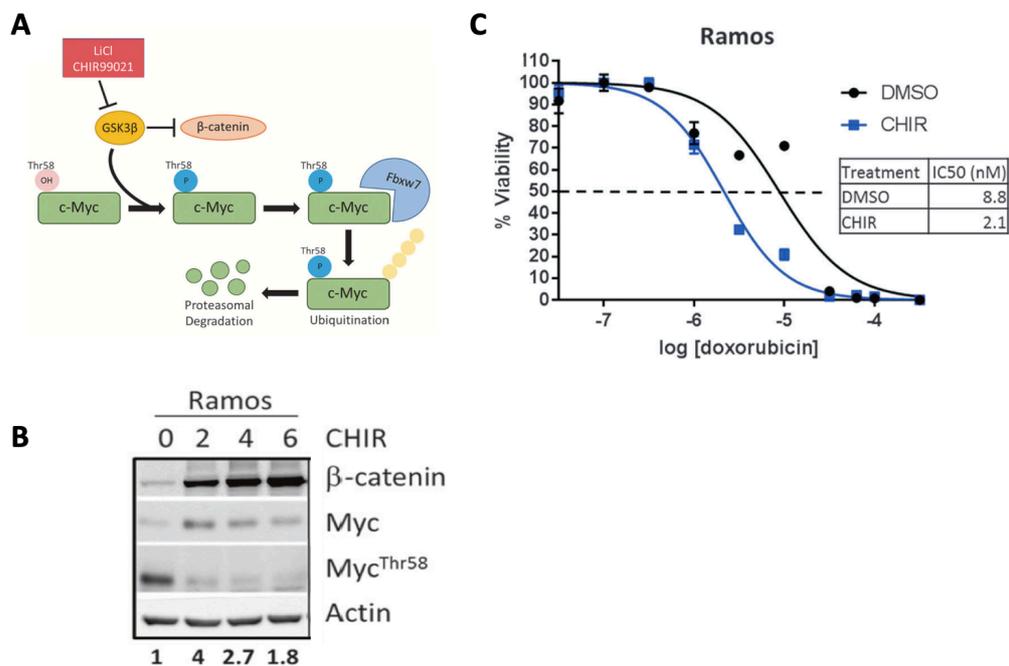


Figure 45 L'inhibition de la GSK-3 β stabilise Myc et augmente la chimiosensibilité des lignées de lymphomes B

(A) Principe de régulation de MYC par la GSK-3 β et l'E ligase FBW7. Les lignées de lymphome B (RAMOS) ont été traitées avec de la doxorubicine à dose croissante en combinaison avec un inhibiteur de GSK-3 β (CHIR99021) ou du DMSO pendant 72h. De façon remarquable, l'inhibition de la GSK-3 β conduisant à l'augmentation de l'expression de c-Myc (B), majore la sensibilité des lignées de lymphomes B à la doxorubicine (C) (adapté de Harrington et al., 2019).

d) Comment un oncogène peut-il devenir un allier dans le traitement du cancer ?

Cette précédente étude permet d'illustrer un concept bien souvent occulté dans le domaine de la recherche fondamentale en oncologie, celui de replacer un oncogène dans un contexte proche de la « vie réelle » c'est-à-dire dans un contexte d'exposition à la chimiothérapie. En effet dans la quasi-totalité des travaux portant sur l'analyse des conséquences induites par l'activation de voies oncogéniques secondaires à l'acquisition de certaines mutations *driver* dans les cancers, cette analyse se fait dans un état d'observation « naïf » où le comportement des cellules porteuses de ces altérations est interprété de façon brut, conduisant bien souvent à conclure aux caractères délétères de telle ou telle mutation car responsable d'une prolifération accrue ou d'un blocage du processus de différenciation. Il est en fait essentiel de replacer une altération oncogénique dans un environnement proche du réel. Comme le montre cette étude, c-Myc pris indépendamment et de façon basale est certes un oncogène puissant et pro-prolifératif mais quand on ajoute la « variable » chimiothérapie dans cette à équation on constate que l'impact de c-Myc s'inverse et il devient un « sensibilisateur » à la chimiothérapie grâce aux mêmes propriétés qui faisaient de cet oncogène un des *master gene* du cancer. Pour résumé, un oncogène peut certes jouer un rôle central dans l'initiation et la prolifération d'un cancer mais il peut également constituer un levier thérapeutique dans le cadre du traitement de ce même cancer qu'il a pourtant lui-même contribué à initier et dont il a participé à l'expansion, et ce à partir du moment où le patient reçoit de la chimiothérapie, via la fragilité ou l'équilibre précaire qu'il induit. Il devient donc inutile voir contre-productif de chercher à l'inhiber dans ce type de situation, les auteurs allant même jusqu'à suggérer qu'une stabilisation de c-Myc serait plus bénéfique qu'une inhibition dans un contexte d'exposition à de la chimiothérapie. Cette approche bouleverse le paradigme actuellement admis en oncologie où l'objectif repose sur un ciblage des oncogènes préalablement identifiés sans tenir compte de la susceptibilité à la chimiothérapie que ces-derniers pourraient induire.

Définitions des objectifs du travail de thèse

La compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des rechutes qui conduirait à la mise en évidence de nouvelles pistes thérapeutiques est un des enjeux majeurs dans la prise en charge des LAL-T. Les objectifs de ce travail de thèse se sont articulés autour de deux grands axes principaux complémentaires qui ont cherché à répondre à cet enjeu.

- 1- La première partie du travail s'est concentrée sur l'exploration de nouvelles altérations impliquées dans la rechute des LAL-T grâce à une approche par séquençage à haut débit réalisée au sein de notre cohorte de LAL-T adultes et pédiatriques protocolaires. La mise en évidence de l'impact pronostique associé à la présence d'altérations oncogéniques spécifiques nous a conduit à proposer une nouvelle stratification du risque dans les LAL-T.
- 2- Dans la deuxième partie du travail nous avons démontré l'application translationnelle de notre approche exploratoire. Ainsi, au-delà de l'impact pronostique associé à certaines altérations, nous avons démontré que l'identification de ces altérations pouvait également constituer de nouvelles cibles thérapeutiques dans les LAL-T et déboucher sur des propositions thérapeutiques innovantes.

Résultats

Partie 1) À la recherche de nouveaux facteurs pronostiques dans les LAL-T

Article 1. Exploration des altérations d'*IKZF1* dans les LAL-T

Dans ce travail publié dans *Blood* en 2021, nous avons exploré l'impact des altérations du gène *IKZF1* codant pour le facteur de transcription Ikaros qui joue un rôle majeur au cours de la lymphopoïèse. Jusqu'ici les altérations d'*IKZF1* (mutations et délétions) avaient été principalement décrites dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) alors que leurs incidences et leurs impacts pronostiques dans les hémopathies T immatures demeuraient inconnus. Nous avons analysé à la fois le statut mutationnel et délétionnel de ce gène à partir de notre cohorte de plus de 1200 patients atteints de LAL-T ou de lymphomes lymphoblastiques T (LBL-T). Cette analyse a été réalisée à partir des données de NGS (*Next Generation Sequencing*) pour l'identification des SNV (*single nucleotide variant*) de façon classique. En revanche, l'analyse des CNV (*copy number variant*) du gène *IKZF1* s'est faite en utilisant une approche récemment mise au point consistant à évaluer le ratio de profondeur de séquençage du gène d'intérêt pour chaque patient après normalisation sur le reste des patients du run de séquençage. Cette approche nous a permis d'identifier les patients potentiellement porteurs d'une délétion d'*IKZF1* (soit délétion complète soit segmentaire) que nous avons ensuite confirmé avec une 2^o technique comme la MLPA ou la CGH array.

Grâce à ces approches expérimentales nous avons pu mettre en évidence l'existence d'altérations d'*IKZF1* dans près de 7% des LAL-T/LBL-T (40 délétions et 42 mutations). Ces altérations étaient mutuellement exclusives et aucune inactivation bi-alléliques d'*IKZF1* n'était retrouvée. Il semblerait que dans les LAL-T et contrairement aux formes B, les altérations d'*IKZF1* seraient à l'origine d'une haplo-insuffisance (délétion complète du gène) plutôt que d'un effet dominant négatif (délétion des exons 4 à 7).

D'un point de vue clinique, les altérations d'*IKZF1* étaient plus fréquemment retrouvées chez les patients âgés, dans les LAL-T avec un profil de type immature et s'associait d'un point de vue oncogénique aux altérations de la voie RAS. De façon notable, les patients présentant une altération d'*IKZF1* présentaient un pronostic plus défavorable que les patients *IKZF1*^{WT}, à la fois dans la population adulte et pédiatrique. Ainsi, ces patients présentaient un taux de rechute augmenté et une survie globale (OS) diminuée ; 5y-OS : 37% vs. 73% ; HR: 2.94, 95%CI[1.74-4.96]; p<0.001. Au total, ce travail rapportait pour la première fois l'incidence et

l'impact pronostique associés aux altérations d'*IKZF1* dans les LAL-T et proposait une prise en compte de ces altérations en vue d'une future stratification thérapeutique dans les LAL-T.

Article I

Titre :

IKZF1 alterations predict poor prognosis in adult and pediatric T-ALL

Co-auteurs :

Mathieu Simonin, Ludovic Lhermitte, Marie-Emilie Dourthe, Etienne Lengliné, Carlos Graux, Nathalie Grardel, Jean-Michel Cayuela, Isabelle Arnoux, Virginie Gandemer, Norbert Ifrah, Hervé Dombret, André Baruchel, Elizabeth Macintyre, Arnaud Petit, Nicolas Boissel, Vahid Asnafi.

État de article :

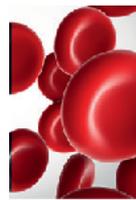
Publié

Nom de la revue :

Blood

Année de Publication :

2021



TO THE EDITOR:

IKZF1 alterations predict poor prognosis in adult and pediatric T-ALL

Mathieu Simonin,^{1,3} Ludovic Lhermitte,^{1,3} Marie-Emilie Dourthe,^{1,3,4} Etienne Lengliné,⁵ Carlos Graux,⁶ Nathalie Gardel,⁷ Jean-Michel Cayuela,⁸ Isabelle Arnoux,⁹ Virginie Gandemer,¹⁰ Norbert Ifrah,¹¹ Hervé Dombret,⁵ André Baruchel,⁴ Elizabeth Macintyre,^{1,3} Arnaud Petit,^{2,12} Nicolas Boissel,⁵ and Vahid Asnafi^{1,3}

¹Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker Enfants-Malades, Université de Paris, Paris, France; ²Department of Pediatric Hematology and Oncology, AP-HP, Armand Trousseau Hospital, Sorbonne Université, Paris, France; ³Institut Necker-Enfants Malades (INEM), INSERM U1151, Paris, France; ⁴Department of Pediatric Hematology and Immunology, Robert Debré Hospital, AP-HP, University Paris Diderot, Paris, France; ⁵Université Paris Diderot, Institut Universitaire d'Hématologie, EA-3518, AP-HP, University Hospital Saint-Louis, Paris, France; ⁶Department of Hematology, Université Catholique de Louvain, CHU UCL Namur-site Godinne, Yvoir, Belgium; ⁷Laboratory of Hematology, Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) Lille, Lille, France, and U1172, INSERM, Lille, France; ⁸Laboratory of Hematology and EA 3518 University Hospital Saint-Louis, AP-HP, Université de Paris; ⁹Hematology Laboratory, Marseille University Hospital Timone, Marseille, France; ¹⁰Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital of Rennes, Rennes, France; ¹¹PRES LUNAM (Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur—l'Université Nantes Angers Le Mans), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Angers Service des Maladies du Sang, INSERM U892, Angers, France; and ¹²Université Pierre et Marie Curie Université Paris 06, Unité Mixte de Recherche en Santé (UMRS) 938, Centre de Recherche (CDR) Saint Antoine GRC n°07, GRC MyPAC (Groupe de Recherche Clinique sur les Myéloproliférations Aiguës et Chroniques), Paris, France

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LBL) are aggressive neoplasms that result from the proliferation of T-lymphoid progenitors blocked at thymic stages of differentiation. They account for 15% and 25% of pediatric and adult ALLs, respectively. T-ALL/T-LBL are associated with a wide range of acquired genetic abnormalities that contribute to developmental arrest and abnormal proliferation.^{1,2} Although intensive treatment protocols have markedly improved the outcomes of children with T-ALL, cure rates remain below 60% for adults and 85% for children.³⁻⁵ The prognosis is particularly poor in relapsing patients, highlighting an urgent need for risk stratification factors at diagnosis.^{6,7}

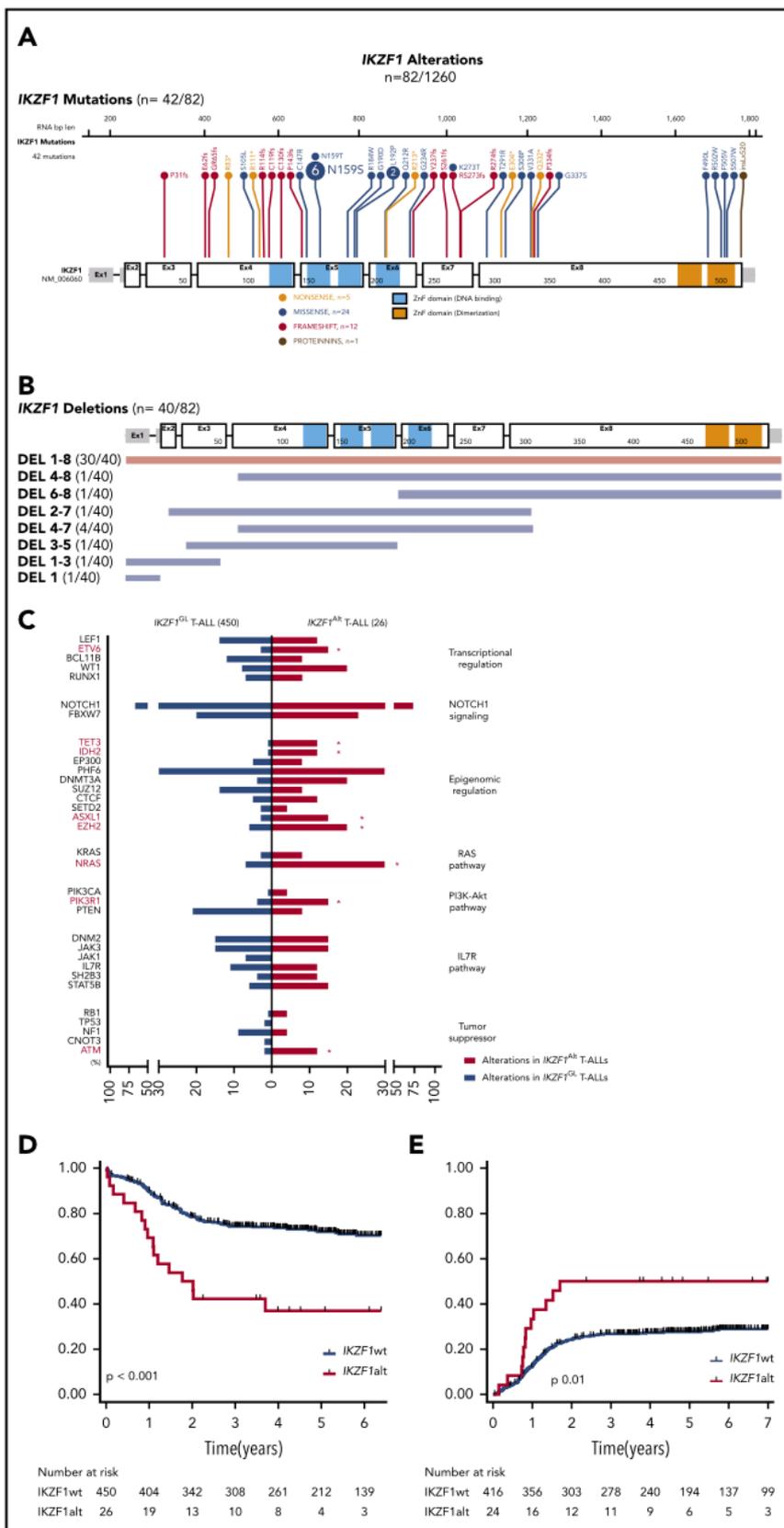
The IKAROS transcription factor (encoded by the *IKZF1* gene on chromosome 7p12.2) is a member of the zinc finger family of DNA-binding proteins that acts as a critical regulator of hematopoiesis and lymphoid differentiation.⁸ *IKZF1* is recurrently affected by various genetic alterations in B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). Genomic alterations in *IKZF1* are found in ~15% of childhood B-ALL cases and in 40% of adult B-ALL cases, with a higher incidence in poor prognosis cases, including *BCR-ABL1* (70%) or *BCR-ABL1*-like (40%) B-ALL.^{9,10} Of note, the *IKZF1* alteration consistently exhibited its poor prognostic impact in B-ALL, and clinical trials increasingly integrate *IKZF1* gene status in risk stratification algorithms.^{11,12}

In contrast, both the incidence and prognostic influence of *IKZF1* alterations in T-ALL/T-LBL are poorly characterized.¹³ To specify the role of *IKZF1* alterations in T-ALL/T-LBL, we conducted a comprehensive analysis using pan-exon deep sequencing of 1260 adult and pediatric T-ALL/T-LBL patients (supplemental Figure 2, available on the *Blood* Web site), including 980 T-ALL cases and 280 T-LBL cases. Diagnostic DNA samples were analyzed by using an 80-gene pan-exon capture-panel (details included in the supplemental Methods). *IKZF1*^{Alt} screening was performed by computational approaches previously described for the detection of copy number variants from next-generation sequencing data.¹⁴ *IKZF1* deletions were confirmed with multiplex ligation-dependent probe

amplification (MLPA) analysis and/or microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH). Patient protocols and clinical trials,^{3,15,16} immunophenotypic and molecular characterization of T-ALL and T-LBL samples, minimal residual disease (MRD) assessment, gene mutation screening, array CGH, MLPA, statistical analysis, and additional details are included in the supplemental Methods.

IKZF1 mutations were identified in 42 cases, including 33 (3.4%) of 980 T-ALL cases and 9 (3.2%) of 280 T-LBL cases (Figure 1A). The majority of mutations were missense (24 of 42 [60%]) within a mutational hotspot in exon 5 affecting amino acid p.N159 (N159S/T) located in the DNA-binding domain. Interestingly, this mutation was recently described in a new combined immunodeficiency syndrome with potential risk of T-ALL predisposition.^{17,18} We also detected frameshift or nonsense mutations (17 of 42 [40%]) affecting exons 3-8 and predicted to truncate the protein before the C-terminal dimerization domain, resulting in haploinsufficiency. *IKZF1* deletions were detected in 40 cases (3%) including 37 (3.8%) of 980 and 3 (1.5%) of 280 in T-ALL and T-LBL, respectively (Figure 1B). All were confirmed by MLPA and/or array CGH (supplemental Figure 2; supplemental Figure 3A-B). Of note, most cases (30 of 40 [75%]) harbored pan-genic deletions (exons 1-8), leading to haploinsufficiency; only 10% (4 of 40) intragenic deletions (exons 4-7), predicted to induce a dominant-negative effect, were observed. This suggests that, in contrast to B-cell precursor-ALL (BCP-ALL),¹² the main consequences of *IKZF1* deletions in T-ALL would be haploinsufficiency rather than a dominant-negative effect. *IKZF1* deletions and mutations were mutually exclusive, and no biallelic inactivation of *IKZF1* was observed, suggesting that residual *IKZF1* activity may be required for T-lineage leukemogenesis. Overall, *IKZF1*^{Alt} was identified in 82 (6.5%) of 1260 T-ALL/T-LBL cases (7.1% T-ALL and 4.3% T-LBL) and were more frequent within adult T-ALL/T-LBL cases compared with pediatric cases (54 of 699 adult T-ALL/T-LBL compared with 28 of 561 pediatric cases; *P* = .05) (supplemental Figure 2). The oncoplot highlighting the main computations observed and mutations within individual *IKZF1*^{Alt} cases are reported in supplemental Table 3 and supplemental Figure 4.

Figure 1. IKZF1 mutational and deletion patterns according to patient occurrence. (A) Gene map describing *IKZF1* intragenic mutational patterns according to patient occurrence. (B) Gene map describing *IKZF1* deletion patterns according to patient occurrence. (C) Genetic profiles of *IKZF1*^{Alt} T-ALL in the FRALLE and GRAALL 03-05 protocols. Comparison of mutational profiles according to pathways between *IKZF1*^{Alt} T-ALLs (n = 26) and *IKZF1*^{Del} T-ALLs (n = 450), with a focus on alterations found in at least 5% of the whole cohort. Percent frequencies in each group are indicated. Genes are grouped according to functional categories. OS (D) and cumulative incidence of relapse (E) in FRALLE and GRAALL treated patients. *P < .05. IL7R, interleukin-7 receptor; PI3K-Akt, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B.



We then investigated the clinical characteristics linked to *IKZF1*^{Alt} in a subset of 476 patients, including 215 adults enrolled in the GRAALL-2003/05 trials and 261 children enrolled in the

FRALLE-2000 trial (GRAALL-2003, #NCT00222027; GRAALL-2005, #NCT00327678) (Table 1; supplemental Methods). Diagnostic peripheral blood or bone marrow samples from 1258 adults and

Table 1. Clinico-biological and outcome characteristics of adult and pediatric T-ALL cases (GRAALL and FRALLE protocols) according to IKZF1 status

Characteristic	No. (%) of patients or median (95% CI)						P
	IKZF1 ^{Alt}		IKZF1 ^{GL}		Total		
Total	26	(5.5%)	450	(94.5%)	476	(100%)	
Clinical subsets analyzed							
Male sex	21	(81%)	339	(75%)	360	(75%)	.6
Age, median (range), y	23.5	(1.1-59.1)	15.2	(1.2-59)	15.4	(1.1-59.1)	.1
Median WBC (range), ×10 ⁹ /L	74.1	(2.8-641)	63.4	(0.3-980)	63.8	(0.3-980)	.3
CNS involvement	4/26	(15%)	47/448	(11%)	51/474	(11%)	.5
ETP classification	4/16	(25%)	51/291	(18%)	55/307	(18%)	.5
TCR status	17		295		312		
Immature (IM0/δ/γ)	8	(47%)	60	(20%)	68	(22%)	.02*
Cortical (IMB, preαβ)	5	(29%)	154	(52%)	159	(51%)	.08
Mature TCRαβ	3	(18%)	42	(14%)	45	(14%)	.7
Mature TCRγδ	1	(6%)	39	(13%)	40	(13%)	.7
Oncogenetics	24		390		414		
TLX1	1	(4%)	53	(14%)	54	(13%)	.3
TLX3	4	(17%)	68	(17%)	72	(17%)	.9
SIL-TAL1	2	(8%)	55	(14%)	57	(14%)	.6
CALM-AF10	1	(4%)	12	(3%)	13	(3%)	.5
None of above	16	(67%)	202	(52%)	218	(53%)	.2
HOXA positive	4/21	(19%)	74/315	(23%)	78/336	(24%)	.8
N/F-R/P classifier	26		450		476		
High-risk classifier	15	(58%)	198	(44%)	213	(45%)	.2
NOTCH1/FBXW7 ^{mut}	19	(73%)	302	(67%)	321	(67%)	.7
K/N-RAS ^{mut}	8	(31%)	41	(9%)	49	(10%)	.003*
PTEN ^{altered}	2	(8%)	80	(18%)	82	(17%)	.3
Treatment response							
CR	24/26	(92%)	416/450	(92%)	440/476	(92%)	1
Prednisone response	14/26	(54%)	245/441	(56%)	259/467	(55%)	1
MRD1 ≥10 ⁻⁴	12/18	(67%)	111/322	(34%)	123/340	(36%)	.01*
HSCT	3/24	(13%)	93/416	(22%)	96/440	(22%)	.3
Outcome							
5 y CIR (95% CI)	50%	(32-71)	28%	(24-32)	29%	(25-33)	.01*
5 y OS (95% CI)	37%	(19-55)	73%	(69-77)	71%	(67-75)	<.001*
	Univariate analysis			Multivariate analysis			
	SHR	95% CI	P	SHR	95% CI	P	
CIR							
Age*	1.01	0.98-1.0	.57	—	—	—	
Log(WBC)*	1.62	1.20-2.18	.02	1.60	1.18-2.17	.003	
Prednisone response	0.67	0.47-0.95	.026	0.92	0.63-1.34	.66	
4-gene classifier†	2.78	1.94-3.99	<.001	2.69	1.86-3.88	<.001	
IKZF1 ^{Alt}	2.12	1.17-3.86	.013	2.15	1.18-3.91	.012	
OS							
Age*	1.03	1.01-1.05	.001	1.04	1.02-1.06	<.001	
Log(WBC)*	1.99	1.48-2.67	<.001	2.04	1.49-2.79	<.001	
Prednisone response	0.54	0.38-0.76	<.001	0.79	0.55-1.15	.21	
4-gene classifier†	2.93	2.06-4.17	<.001	2.88	2.00-4.16	<.001	
IKZF1 ^{Alt}	2.94	1.74-4.96	<.001	2.80	1.61-4.88	<.001	

MRD1 corresponds to MRD evaluation after induction and was performed by allele-specific oligonucleotides polymerase chain reaction. T-cell receptor (TCR) status and oncogenic evaluations were performed as described in the supplemental Methods. CIR, cumulative incidence of relapse; CNS, central nervous system; CR, complete remission; ETP, early thymic precursor; N/F-R/P classifier, NOTCH1/FBXW7-RAS/PTEN classifier (as previously described); HR, hazard ratio; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; SHR, specific hazard ratio; WBC, white blood cell.

Univariate and multivariate analyses of cumulative incidence of relapse and OS: *Continuous variables; †Presence of RAS/PTEN alteration and/or absence of NOTCH1/FBXW7 mutations.

children with T-ALL or T-LBL were analyzed after informed consent was obtained at diagnosis according to the Declaration of Helsinki. The incidence of *IKZF1*^{Alt} in this cohort was 5.5% (26 of 476), including 16 deletions and 10 mutations. *IKZF1*^{Alt} were observed in 7% of adults and 4.2% of children ($P = .2$), with a median age slightly higher in *IKZF1*^{Alt} cases (23.5 years vs 15.2 years; $P = .1$). *IKZF1*^{Alt} was associated with an immature immunophenotype (47% vs 20%; $P = .02$). In line with this finding, *IKZF1*^{Alt} correlated positively with abnormalities known to be associated with an immature phenotype, including K/N-RAS mutations (31% vs 9%; $P = .003$), *EZH2* (5 of 26 [20%] vs 27 of 450 [6%]; $P = .02$), *ASXL1* (4 of 26 [15%] vs 15 of 450 [3%]; $P = .02$), *ETV6* (4 of 26 [15%] vs 13 of 450 [3%]; $P = .01$), and *DNMT3A* (5 of 26 [20%] vs 17 of 450 [4%]; $P = .045$) mutations (Figure 1C). Conversely, *IKZF1*^{Alt} were virtually exclusive, with *SIL-TAL1*⁺ and *PTEN* altered cases known to be associated with a mature T-cell receptor- $\alpha\beta$ lineage.

In BCP-ALL, *IKZF1*^{Alt} are enriched in the high-risk subgroup of *Ph*⁺ BCP-ALL and recently characterized by the presence of a gene expression profile similar to *Ph*⁺ ALL but lacking the canonical *BCR-ABL1* fusion, therefore named *BCR-ABL1-like* or *Ph*⁺-like ALL.^{9,19} Importantly, *Ph*⁺-like signature is virtually absent in T-ALL.²⁰ In contrast, here we observed that *IKZF1*^{Alt} are associated with epigenetic mutations/deletions.

Interestingly, *IKZF1*-deficient mice develop T-cell malignancy with high penetrance, highlighting the suppressor function for IKAROS in T-cell lineage.²¹ Furthermore, in murine T-cell leukemogenesis, IKAROS directly cooperates with NOTCH1 activation to promote leukemia.^{22,23} This crosstalk between NOTCH1 and IKAROS could explain the discrepancy observed concerning the pattern of *IKZF1*^{Alt} in T-ALL vs *Ph*⁺-like BCP-ALL, and it led us to suspect a specific oncogenic mechanism associated with *IKZF1*^{Alt} in T-ALL requiring further investigations.

IKZF1^{Alt} cases did not differ significantly with regard to sex, white blood cell count, central nervous system involvement, and prednisone response (Table 1). Although *IKZF1*^{Alt} did not affect the complete remission rate, patients with *IKZF1*^{Alt} were more likely to have a positive postinduction MRD (10⁻⁴ threshold, 67% vs 34%; $P = .01$). Patients with *IKZF1*^{Alt} had an inferior outcome compared vs those with *IKZF1*^{GL}, with a higher cumulative incidence of relapse (5-year cumulative incidence of relapse, 50% vs 28%; specific hazard ratio, 2.12; 95% confidence interval [CI], 1.17-3.86) and a shorter overall survival (OS) (5-year OS, 37% vs 73%; hazard ratio, 2.94; 95% CI, 1.74-4.96) (Figure 1D-E). This prognostic impact was observed in both pediatric and adult cohorts (supplemental Figure 5A-D). Of note, the 10 *IKZF1*-mutated and 16 *IKZF1*-deleted cases exhibited comparable clinico-biological features and were associated with worse prognosis compared with *IKZF1*^{GL} cases (supplemental Table 4; supplemental Figure 6). In multivariate analysis, considering variables associated with OS in univariate analyses as covariates, *IKZF1*^{Alt} remained significantly associated with a shorter OS, even after inclusion of postinduction MRD in the model (supplemental Table 5). It is noteworthy that the prognostic impact of *IKZF1*^{Alt} status was also observed after adjustment on the 4-gene *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* classifier and postinduction MRD, which identified poor prognosis patients in both GRAALL and FRALLE trials.^{3,4}

In conclusion, we describe *IKZF1*^{Alt} among 1260 children and adults with immature T-ALL/T-LBL and define for the first time its frequency and, importantly, its poor outcome in T-ALL in multivariate models. *IKZF1*^{Alt} should be considered as a significant prognosis marker in addition to MRD and the 4-gene oncogenetic classifier to predict poor outcomes in T-ALL.

Acknowledgments

The authors thank all participants in the GRAALL-2003 and GRAALL-2005 study groups, the Société Française de lutte contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent (SFCE), and the investigators of the 16 SFCE centers involved in collection and provision of data and patient samples. They also thank V. Lheritier for collection of clinical data.

The GRAALL was supported by grants P0200701 and P030425/AOM03081 from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique, Ministère de l'Emploi et de la Solidarité in France, and the Swiss Federal Government in Switzerland. Samples were collected and processed by the AP-HP "Direction de Recherche Clinique" Tumor Bank at Necker-Enfants Malades. M.S. was supported by "Soutien pour la formation à la recherche translationnelle en cancérologie dans le cadre du Plan cancer 2009-2013." This work was supported by grants to Necker laboratory from the "Association Laurette Fugain," Association pour la Recherche contre le Cancer (Equipe Labellisée), Institut National du Cancer PRT-K 18-071, and the Fédération Leucémie espoir and Horizon Hemato.

Authorship

Contribution: N.B., V.A., and M.S. conceived the study and oversaw the project; M.S., M.-E.D., L.L., E.L., C.G., N.G., J.-M.C., I.A., V.G., N.I., H.D., A.B., A.P., and N.B. provided study materials or patients; M.S., L.L., E.M., and V.A. performed molecular analyses; M.S., L.L., and V.A. collected and assembled data; N.B. and M.S. performed statistical analysis; M.S., L.L., V.A., and N.B. analyzed and interpreted data; M.S., N.B., E.M., and V.A. wrote the manuscript; and all authors approved the manuscript.

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

ORCID profiles: N.G., 0000-0001-6573-1312; N.I., 0000-0003-3063-850X; A.P., 0000-0001-8363-1622.

Correspondence: Vahid Asnafi, Laboratory of Onco-Hematology, Tour Pasteur 2eme etage, Necker Enfants Malades Hospital, 149 Rue de Sevres, 75015 Paris, France; e-mail: vahid.asnafi@aphp.fr; or Nicolas Boissel, Hôpital Saint-Louis, Service d'Hématologie Adulte, 1 Avenue Claude Vellefaux 75010 Paris, France; e-mail: nicolas.boissel@aphp.fr.

Footnotes

Submitted 10 July 2020; accepted 17 October 2020; prepublished online on *Blood* First Edition 4 November 2020.

E-mail the corresponding author for original data.

The online version of this article contains a data supplement.

REFERENCES

1. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3398-3406.
2. Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood*. 2017;129(9):1113-1123.
3. Petit A, Trinquand A, Chevret S, et al; French Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group (FRALLE). Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2018;131(3):289-300.

4. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J Clin Oncol*. 2013;31(34):4333-4342.
5. Gökbüget N, Kneba M, Raff T, et al; German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*. 2012;120(9):1868-1876.
6. Gökbüget N, Stanze D, Beck J, et al; German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood*. 2012;120(10):2032-2041.
7. Desjonquères A, Chevallier P, Thomas X, et al. Acute lymphoblastic leukemia relapsing after first-line pediatric-inspired therapy: a retrospective GRAALL study. *Blood Cancer J*. 2016;6(12):e504.
8. Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell*. 1994;79(1):143-156.
9. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al; Children's Oncology Group. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360(5):470-480.
10. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446(7137):758-764.
11. Stanulla M, Cavé H, Moorman AV. IKZF1 deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: still a poor prognostic marker? *Blood*. 2020;135(4):252-260.
12. Vairy S, Tran TH. IKZF1 alterations in acute lymphoblastic leukemia: the good, the bad and the ugly. *Blood Rev*. 2020;44:100677.
13. Marçais A, Jeannot R, Hernandez L, et al. Genetic inactivation of Ikaros is a rare event in human T-ALL. *Leuk Res*. 2010;34(4):426-429.
14. Nord AS, Lee M, King MC, Walsh T. Accurate and exact CNV identification from targeted high-throughput sequence data. *BMC Genomics*. 2011;12(1):184.
15. Huguet F, Leguay T, Raffoux E, et al. Pediatric-inspired therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL-2003 study [published correction appears in *J Clin Oncol*. 2009;27(15):2574]. *J Clin Oncol*. 2009;27(6):911-918.
16. Huguet F, Chevret S, Leguay T, et al; Group of Research on Adult ALL (GRAALL). Intensified therapy of acute lymphoblastic leukemia in adults: report of the Randomized GRAALL-2005 Clinical Trial. *J Clin Oncol*. 2018;36(24):2514-2523.
17. Boutboul D, Kuehn HS, Van de Wynaert Z, et al. Dominant-negative IKZF1 mutations cause a T, B, and myeloid cell combined immunodeficiency. *J Clin Invest*. 2018;128(7):3071-3087.
18. Yoshida N, Sakaguchi H, Muramatsu H, et al. Germline IKAROS mutation associated with primary immunodeficiency that progressed to T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(5):1221-1223.
19. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):125-134.
20. van der Veer A, Waanders E, Pieters R, et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood*. 2013;122(15):2622-2629.
21. Marke R, van Leeuwen FN, Scheijen B. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2018;103(4):565-574.
22. Mantha S, Ward M, McCafferty J, et al. Activating Notch1 mutations are an early event in T-cell malignancy of Ikaros point mutant *Plastic/+* mice. *Leuk Res*. 2007;31(3):321-327.
23. Kleinmann E, Geimer Le Lay AS, Sellars M, Kastner P, Chan S. Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development. *Mol Cell Biol*. 2008;28(24):7465-7475.

DOI 10.1182/blood.2020007959

© 2021 by The American Society of Hematology

TO THE EDITOR:

Early assessment of clofarabine effectiveness based on measurable residual disease, including AML stem cells

Diana Hanekamp, Lok Lam Ngai, Jeroen J. W. M. Janssen, Arjan van de Loosdrecht, Gert J. Ossenkoppele, and Jacqueline Cloos

Department of Hematology, Amsterdam UMC, Vrije Universiteit Amsterdam, Cancer Center Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common form of acute leukemia in adults and is characterized by heterogeneity in cytogenetics and molecular aberrations.¹ While insights in the pathogenesis and clonal landscape of AML has increased, the backbone of induction therapy has been the same for many years. In 1973, "7 + 3" cytarabine plus anthracycline chemotherapy was first described,² achieving a 5-year overall survival (OS) of ~40% to 50% in young patients³ and 20% to 30% in elderly patients.⁴ Several new (targeted) agents have been recently approved for AML,⁵ which look promising in a subgroup of patients,⁶ and some (untargeted) chemotherapeutic agents have been introduced. Clofarabine (2-chloro-2'-fluoro-deoxy-9-β-D-arabinofuranosyladenine; a second-generation purine nucleoside analog), has shown potential benefit in young⁷ and older⁸ AML patients. However, as clofarabine was associated with a risk of severe complications in some studies^{9,10} but well tolerated in others,^{11,12} further evaluation in dosing and scheduling was warranted. In a large phase 3 study of the

Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group–Swiss Group for Clinical Cancer Research, with ≥800 patients enrolled, a significant favorable effect of clofarabine (added to idarubicin and Ara-C) was seen in the European LeukemiaNet (ELN) intermediate-I prognostic risk subgroup¹³ (event-free survival, 26% ± 4% vs 40% ± 5%; Cox *P* = .002; OS, 29% ± 5% vs 50% ± 6%; Cox *P* < .001).¹⁰

One of the secondary objectives of the study was the assessment of efficacy according to measurable residual disease (MRD). Multiparameter flow cytometry (MFC)-MRD identifies leukemic cells, which can be distinguished from normal cells based on the presence of leukemia-associated immunophenotypes.¹⁴ In addition, specific antibody panels allowed MFC assessment of leukemic stem cells (LSCs).¹⁵ Samples for MFC-(LSC)-MRD detection were available for a subset of patients, and the time point of MFC-MRD assessment after 2 cycles of treatment was used for further analysis (median, 82 days after start of therapy; range,

1 SUPPLEMENTAL DATA

2 ***IKZF1* alterations predict poor prognosis in adult and pediatric T-ALL**

3

4 **Contents:**

5 - Supplemental **Methods**

6 - Supplemental **Table 1:** Custom capture Nextera XT gene panel

7 - Supplemental **Table 2:** Chemotherapy in the FRALLE 2000 standard risk group T1 and high risk T2

8 - Supplemental **Table 3:** Significant co-occurring mutations in patients with *IKZF1*^{Alt}

9 - Supplemental **Table 4:** Clinico-biological and outcome characteristics of adult and pediatric T-ALLs
10 (GRAALL and FRALLE protocols) according to *IKZF1*^{Alt}

11 - Supplemental **Table 5:** Univariate and multivariate analysis of Cumulative Incidence of Relapse (CIR)
12 and Overall Survival (OS) when MRD1 is added in the Cox model.

13 - Supplemental **Figure 1:** General design of FRALLE 2000 T guidelines

14 - Supplemental **Figure 2:** Flow chart followed to screen a cohort of 1260 patients for *IKZF1*^{Alt}

15 - Supplemental **Figure 3:** *IKZF1* mutational and deletion patterns by patient occurrence

16 - Supplemental **Figure 4:** Genetic profiles of *IKZF1*^{Alt} T-ALL in the FRALLE and GRAALL 03-05 protocols

17 - Supplemental **Figure 5:** OS and CIR in the two subgroups (FRALLE and GRALL 03/05)

18 - Supplemental **Figure 6:** OS in the two subgroups of *IKZF1*^{Alt} vs *IKZF1*^{GL} (FRALLE and GRALL 03/05)

19 - Supplemental **References**

20

21

22

23

24

25 **SUPPLEMENTAL METHODS**

26 **Patient's protocol and clinical trials**

27 Diagnostic peripheral blood or bone marrow samples from 1258 adults and children with T-ALL or LBL-
28 T were analyzed after informed consent was obtained at diagnosis according to the Declaration of
29 Helsinki.

30 About 215 adult patients aged from 16-59 years, were included in the GRAALL03/05 trials which were
31 registered at clinicaltrials.gov (GRAALL-2003, #NCT002222027; GRAALL-2005, #NCT00327678).

32 About 261 pediatric patients aged from 1-19 years, were treated in 10 French pediatric hematology
33 departments, members of the FRALLE study group, according to the FRALLE 2000 T guidelines:

34 Definitions: Good prednisone response (GPR) was defined as < 1000 circulating blasts/ μ L on day 8,
35 poor prednisone response (PPR) when \geq 1000 circulating blasts/ μ L on day 8. Morphologic assessment
36 of a bone marrow aspirate was done at day 21. A chemosensitivity was represented by \leq 5% blasts, a
37 chemoresistance by > 5%. Complete remission (CR) was defined as: absence of physical signs of
38 leukemia, bone marrow with active hematopoiesis and < 5% leukemic blast cells (identified
39 morphologically), and normal cerebrospinal fluid. Patients were stratified into two groups.

40 Treatment stratification: Standard risk group (T1) was defined by the presence of all the following
41 criteria: good prednisone response (GPR) at day 8, chemosensitivity (CHs) at day 21, MRD < 10⁻² at day
42 35. High risk group (T2) was defined by the presence of one of the following criteria: poor prednisone
43 response (PPR) at day 8, chemoresistance at day 21 or MRD \geq 10⁻² at day 35. Patients treated according
44 to T2 group were eligible for allogeneic stem cell transplantation (SCT) after late intensification n°1
45 when a matched sibling or unrelated donor was available.

46 The study included also **782 patients** who were not involved in these clinical trials. Studies were
47 conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by local and multicenter
48 research ethical committees.

49 **Immunophenotypic and molecular characterization of T-ALL samples**

50 Peripheral blood (PB) or bone marrow (BM) T-ALL samples were analyzed for immunophenotype,
51 fusion transcripts (SIL-TAL1, CALM-AF10), oncogenic transcripts (HOXA9, TLX1 and TLX3), and T-cell
52 receptor (TCR) recombination and NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN mutations, as previously described.¹⁻³

53

54 **Minimal residual disease assessment**

55 Immunoglobulin/T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangement based MRD evaluation was centrally
56 assessed for patients who reached complete remission after the first induction cycle, on BM samples
57 after induction (MRD1). MRD was centrally assessed by real-time quantitative allele-specific
58 oligonucleotide PCR and interpreted according to EuroMRD group guidelines.⁴⁻⁶

59 **Gene mutation screening**

60 A custom capture Nextera XT gene panel (Illumina, San Diego, CA) targeting all coding exons and their
61 adjacent splice junctions of 80 genes was designed, based on available evidence in hematological
62 neoplasms (**supplemental Table 1**). DNA Libraries were prepared using Nextera Rapid Capture
63 Enrichment protocol and underwent 2x150bp paired-end sequencing on Illumina MiSeq sequencing
64 system with MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). Briefly, sequence reads were filtered and mapped to the
65 human genome (GRCh37/hg19) using in-house software (Polyweb, Institut Imagine, Paris). Annotated
66 variants were selected after filtering out calls according to the following criteria: (i) coverage < 30x,
67 <10 alternative reads or variant allelic fraction (VAF) <7%; (ii) Polymorphisms described in dbSNP,
68 1000Genomes, EVS, Gnomad and EXAC with a calculated mean population frequency >0.1%. Non-
69 filtered variants were annotated using somatic database COSMIC (version 78) and ProteinPaint (St Jude
70 Children's Research Hospital – Pediatric Cancer data portal), published data and in-silico prediction
71 effect.

72 **Copy number evaluation from next-generation sequencing (NGS) data**

73 We performed a computational approach previously described for the detection of copy number
74 variants (CNVs) from next-generation sequence data.⁷⁻⁹ We carried out a systematic analysis of depth
75 of coverage on *IKZF1* gene. The strategy for identifying CNVs from NGS data is based on variations in
76 depth of coverage of aligned sequence reads. To detect CNVs based on read depth we developed a
77 local algorithm. The CNVs detected with this method were confirmed by high resolution CGH and/or
78 MLPA analysis.

79 **Microarray based Comparative Genomic Hybridization (array CGH)**

80 Diagnostic DNA was hybridized on Affymetrix (Santa Clara, CA) Cytogenetics whole Genome 2.7M
81 Arrays (CGH-array), according to the manufacturer's recommendations. Data analysis was performed
82 with the Chromosome Analysis Suite (ChAS) software (Affymetrix®). Gene copy number (GCN)
83 aberrations were compared with the Database of Genomic variants (DGV)
84 <http://projects.tcag.ca/variation> to study only non-variant GCV aberrations.

85 **Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis (MLPA)**

86 MLPA analysis was performed using the MRC Holland (Amsterdam, The Netherlands) SALSA MLPA
87 probe mix P383-A1 T-ALL and P335-C1 ALL-IKZF1 according to the manufacturer's recommendations.
88 Polymerase chain reaction products were separated by capillary electrophoresis on an ABI-3130
89 device. Coffalyser software, available at [http:// www.mlpa.com](http://www.mlpa.com), was used for the analysis.

90

91 **Statistical analysis**

92 Comparisons for categorical and continues variables between *IKZF1*Alt and *IKZF1*GL subgroups were
93 performed with Fisher's exact test and Mann-Whitney test respectively. Overall survival (OS) was
94 calculated from the date of diagnosis to the last follow-up date censoring patients alive. The
95 cumulative incidence of relapse (CIR) was calculated from the complete remission date to the date of
96 relapse censoring patients alive without relapse at the last follow-up date. Relapse and death in
97 complete remission were considered as competitive events. Univariate and multivariate analyses
98 assessing the impact of categorical and continuous variables were performed with a Cox model.
99 Proportional-hazards assumption was checked before conducting multivariate analyses. In univariate
100 and multivariate analyses, age and log₁₀(WBC) were considered as continuous variables. All analyses
101 were stratified on the trial. Variables with a p value less than 0.1 in univariate analysis were included
102 in the multivariable models. Statistical analyses were performed with STATA software (STATA 12.0
103 Corporation, College Station, TX). All p-values were two-sided, with p<0.05 denoting statistical
104 significance. Circos plots were generated using software available at <http://circos.ca>. Lollipop plots
105 were generated with ProteinPaint (<https://pecan.stjude.org/#/proteinpaint>).

106

107

108

109

110

111

112

113

114 **SUPPLEMENTAL TABLES**

115 **Supplemental Table 1.** Custom capture Nextera XT gene panel

Custom capture Nextera XT gene panel					
AKT1	CTCF	HLA-B	MLL_KMT2A	PTPRD	STAT5B
ARID1A	CTNNB1	HNRNPA1B	MLL2_KMT2	RB1	SUZ12
ASB2	CXCR4	HRAS	NF1	RELN	TAL1
ASXL1	DDX3X	IDH1	NOTCH1	RHOA	TBL1XR1
ATM	DNM2	IDH2	NRAS	RPL10	TDRD6
BCL11B	DNMT3A	IKZF1	ODZ2	RPL5	TET1
CARD11	EED	IL7R	PHF6	RUNX1	TET2
CBL	EP300	IRF2BP2	PIAS1	SAMHD1	TP53
CBLB	ETV6	IRF4	PIK3CA	SETD2	TSR1
CCR4	EZH2	JAK1	PIK3R1	SF3B1	TYK2
CCR7	FAS	JAK3	PLCG1	SH2B3	UTX
CD58	FBXW7	JAKMIP2	POT1	SHP1	VAV1
CEBPA	FLT3	KIT	PRKCB	SKP2	WT1
CNOT3	FOXO3	KRAS	PTEN	SOCS1	ZEB1/TCF8
CREBPP	FYN	LCK	PTPN11	STAT1	ZFP36L2
CSNK1A1	GATA3	LEF1	PTPN2	STAT3	ZRSR2
CSNK2B	GPR183	MGA	PTPRC	STAT5A	
LMO1*	TAL1*	CD28	CISH	ZFHX4	
LMO2*	B2M	STIL	SOCS3		

116

117 **Supplemental Table 2.** Chemotherapy in the FRALLE 2000 standard risk group T1 and high risk T2.

FRALLE2000 GROUP T1		
Drug/Administration route	mg/m ² /day	Day
Prednisone/po-iv	60	1-7
MTX/it	By age*	1
Induction		
Prednisone/po-iv	40	8-28 then tapered
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	8, 15, 22, 29
Daunorubicin/iv	40	8, 9, 10, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	8, 10, 12, 15, 17, 19
Cyclophosphamide/iv	1000	8
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	8, 15
Consolidation		
Tioguanine/po	60	1-22
Cyclophosphamide/iv	1000	1-15
Aracytine/sc	30/12h	1-2, 8-9, 15-16
Prednisone/po-iv	40	29-35
Mercaptopurine/po	50	29-49
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	29, 43
Methotrexate/iv	5000	29, 42
Methotrexate/po	25	36
Leucovorin rescue	15/6h	36h after start HD-MTX
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	1, 15, 29, 43
Delayed intensification n°1		
Dexamethasone/po-iv	10	1-14 then tapered
Vindesine/iv	3 (max: 4 mg)	1, 8, 15
Adriamycine/iv	25	1, 8, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	3, 5, 8, 10, 12, 15
Tioguanine/po	60	29-49
Etoposide	150	29, 36, 43
Aracytine/sc	30/12h	29-30, 36-37, 43-44
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	3, (± 15 [§]), 30, (± 43 [§])
Interphase		
Prednisone/po-iv	40	1-7, 29-35
Mercaptopurine/po	50	17899
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1, 15, 29, 43
Methotrexate/iv	5000	1, 15, 29; 43
Methotrexate/po	25	8, 22, 36
Leucovorin rescue	15/6h	36h after start HD-MTX
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	1, 15, 29, 43 ^{§§}
Cranial irradiation	18 or 24 Gy ^{&}	40-45
Delayed intensification n°2		
Prednisone/po-iv	40	1-14 then tapered
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1, 8, 15
Daunorubicin/iv	40	1, 8, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	3, 5, 8, 10, 12, 15
Tioguanine/po	60	29-49
Cyclophosphamide/iv	1000	29
Aracytine/sc	30/12h	29-30, 36-37, 43-44
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age** ^{§§}	3, 30
Maintenance (18 months)		
Prednisone/po-iv	40	1-7 every 4 weeks ***
Mercaptopurine/po	50	daily
Methotrexate/po	25	weekly
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	Every 4 weeks ***
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age** ^{§§}	Every 3 months, 3 times

FRALLE2000 GROUP T2		
Drug/Administration route	mg/m ² /day	Day
Prednisone/po-iv	60	1-7
MTX/it	By age*	1
Induction		
Prednisone/po-iv	40	8-28 then tapered
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	8, 15, 22, 29
Daunorubicin/iv	40	8, 9, 10, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	8, 10, 12, 15, 17, 19
Cyclophosphamide/iv	1000	8
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	8, 15
Consolidation		
VEDA n°1		
Dexamethasone/po-iv	20	1-5
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1
Aracytine/iv	2000/12h	1, 2
Etoposide/iv	150	3, 4, 5
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	5
COPADM		
Prednisone/po-iv	40	1-5
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1
Adriamycine/iv	25	2
Methotrexate/iv	5000	1
Leucovorin rescue	15/6h	36h after start HD-MTX
Cyclophosphamide	500/12h	2, 3
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	2
VEDA n°2		
identical to n°1		
Delayed intensification n°1		
Dexamethasone/po-iv	10	1-14 then tapered
Vindesine/iv	3 (max: 4 mg)	1, 8, 15
Adriamycine/iv	25	1, 8, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	3, 5, 8, 10, 12, 15
Tioguanine/po	60	29-49
Etoposide	150	29, 36, 43
Aracytine/sc	30/12h	29-30, 36-37, 43-44
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	3, 30, (± 43 [§])
Interphase		
Prednisone/po-iv	40	1-7, 29-35
Mercaptopurine/po	50	17899
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1, 15, 29 (± 43 [§])
Methotrexate/iv	5000	1, 15, 29 (± 43 [§])
Methotrexate/po	25	8, 22, 36
Leucovorin rescue	15/6h	36h after start HD-MTX
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	1, 15, 29 (± 43 [§])
Cranial irradiation	18 to 24 Gy ^{&}	40-45
Delayed intensification n°2		
Prednisone/po-iv	40	1-14 then tapered
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1, 8, 15
Daunorubicin/iv	40	1, 8, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	3, 5, 8, 10, 12, 15
Tioguanine/po	60	29-49
Cyclophosphamide/iv	1000	29
Aracytine/sc	30/12h	29-30, 36-37, 43-44
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age** ^{§§}	3, 30
Maintenance (18 months)		
Prednisone/po-iv	40	1-7 every 4 weeks ***
Mercaptopurine/po	50	daily
Methotrexate/po	25	weekly
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	Every 4 weeks ***
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age** ^{§§}	Every 3 months, 3 times

118

119 **Supplemental Table 2. Chemotherapy in the FRALLE 2000 standard risk group T1 and high risk T2.**

120 Abbreviations: iv, intravenous; po, per os; i.t., intrathecal; sc: subcutaneous

121 * Age-adjusted doses of intrathecal methotrexate: ≥ 1 and < 2 years: 8 mg; ≥ 2 and < 3 years: 10 mg; ≥ 3
122 and < 10 years: 12 mg; ≥ 10 years: 15 mg

123 ** Age-adjusted doses of triple intrathecal MTX, ARA-C and methylprednisolone respectively: ≥ 1 and
124 < 2 years: 8, 15 and 20 mg; ≥ 2 and < 3 years: 10, 20 and 20 mg; ≥ 3 years and < 10 years: 12, 25 and 20
125 mg; ≥ 10 years: 15, 20 and 20 mg

126 *** 12 times, then stopped

127 § in case of CNS involvement

128 & Preventive use: 18 Gy only for patients ≥ 4 years with WBC ≥ 100 G/L at diagnosis; Therapeutic use
129 (CNS involvement at diagnosis): 18 Gy for patients < 4 years, 24 Gy for patients ≥ 4 years

130 §§ Except for irradiated patients

131

132 Supplemental **Table 3**: Significant co-occurring mutations in patients with *IKZF1*^{Alt} is provided as a
133 **supplementary PDF file.**

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147 Supplemental **Table 4:** Clinico-biological and outcome characteristics of adult and pediatric T-ALLs
 148 (GRAALL and FRALLE protocols) according to IKZF1^{Alt}

Characteristic	No (%) of Patients				p		
	IKZF1 ^{Mut}		IKZF1 ^{DEL}			Total	
Total	10	(38%)	16	(62%)	26	(100%)	
Clinical subsets analyzed							
Male sex	7	(70%)	14	(88%)	21	(81%)	ns
Median age, years	28.85	[3.3;59.1]	23.45	[1.1;57.2]	23.5	[1.1;59.1]	ns
Median WBC (G/L)	58.4	[3.2;203]	81	[2.8;641]	74.1	[2.8;641]	ns
CNS involvement	1/10	(10%)	3/16	(19%)	4/26	(15%)	ns
ETP classification	2/8	(25%)	2/8	(25%)	4/16	(25%)	ns
T-cell receptor status							
Immature (IMQ/δ/γ)	4	(50%)	4	(44%)	8	(47%)	ns
Cortical (IMB, preαβ)	1	(12.5%)	4	(44%)	5	(29%)	ns
Mature TCRαβ	2	(25%)	1	(12%)	3	(18%)	ns
Mature TCRγδ	1	(12.5%)	0	(0%)	1	(7%)	ns
Oncogenetics							
<i>TLX1</i>	0	(0%)	1	(7%)	1	(4%)	ns
<i>TLX3</i>	0	(0%)	4	(29%)	4	(17%)	ns
<i>SIL-TAL1</i>	2	(20%)	0	(0%)	2	(8%)	ns
<i>CALM-AF10</i>	0	(0%)	1	(7%)	1	(4%)	ns
None of above	8	(80%)	8	(57%)	16	(67%)	ns
<i>HOXA</i> positive	1/7	(14%)	3/14	(21%)	4/21	(19%)	ns
N/F-R/P classifier							
High Risk classifier	6	(60%)	9	(56%)	15	(58%)	ns
<i>NOTCH1/FBXW7</i> ^{Mut}	8	(80%)	11	(69%)	19	(73%)	ns
<i>K/N-RAS</i> ^{Mut}	3	(30%)	5	(31%)	8	(31%)	ns
<i>PTEN</i> ^{Interead}	2	(20%)	0	(0%)	2	(8%)	ns
Treatment response							
CR	8	(80%)	16	(100%)	24/26	(92%)	ns
Prednisone response	6	(60%)	8	(50%)	14/26	(54%)	ns
MRD1 ^{≥10⁻⁴}	3/6	(50%)	9/12	(75%)	12/18	(67%)	ns
HSCT	0/8	(0%)	3/16	(19%)	3/24	(13%)	ns

149

150 Supplemental **Table 4:** Clinico-biological and outcome characteristics of adult and pediatric T-ALLs
 151 (GRAALL and FRALLE protocols) according to IKZF1^{Alt}

152 Abbreviations: T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood count; CNS, central
 153 nervous system; ETP, early thymic precursor; N/F-R/P classifier, *NOTCH1/FBXW7-RAS/PTEN* classifier
 154 as previously described; CR, complete remission; MRD, minimal residual disease; HSCT, hematopoietic
 155 stem cell transplantation; CIR, cumulative incidence of relapse; OS, overall survival.

156 MRD1 correspond to MRD evaluation after induction and was performed by allele-specific
 157 oligonucleotides polymerase chain reaction. T-cell receptor status and oncogenetics were performed
 158 as previously described.

159

160

161 **Supplemental Table 5:** Univariate and multivariate analysis of Cumulative Incidence of Relapse (CIR)
 162 and Overall Survival (OS) when MRD1 is added in the Cox model.

163

	Univariate analysis					
	CIR			OS		
	SHR	95%CI	p	SHR	95%CI	p
MRD1 $\geq 10^{-4}$	2.59	(1.71 ; 3.92)	<0.001	2.78	(1.76 ; 4.40)	<0.001

164

	Multivariate analysis				
	Multivariate				
CIR	SHR	95%CI	p		
Age*	-	-	-	-	167
Log(WBC)*	2.13	(1.42 ; 3.17)	<0.001		168
Prednisone response	1.06	(0.65 ; 1.73)	0.81		169
4-gene classifier**	2.68	(1.71 ; 4.19)	<0.001		170
MRD1 $\geq 10^{-4}$	2.21	(1.39 ; 3.50)	0.001		
<i>IKZF1</i> ^{alt}	1.88	(0.88 ; 4.01)	0.10		
OS	HR	95%CI	p		
Age*	1.02	(0.99 ; 1.05)	0.28		171
Log(WBC)*	3.12	(1.93 ; 5.03)	<0.001		172
Prednisone response	0.68	(0.39 ; 1.16)	0.16		173
4-gene classifier**	3.24	(1.94 ; 5.40)	<0.001		
MRD1 $\geq 10^{-4}$	1.97	(1.20 ; 3.23)	0.007		
<i>IKZF1</i> ^{alt}	4.98	(2.33 ; 10.66)	<0.001		

174

175 Abbreviations: *continuous variables; **Presence of RAS/PTEN alteration and/or absence of
 176 NOTCH1/FBXW7 mutations. Abbreviations: CIR: cumulative incidence of relapse, OS: overall survival,
 177 HR: hazard ratio, SHR: specific hazard ratio, CI: confidence interval.

178 MRD1 correspond to MRD evaluation after induction and was performed by allele-specific
 179 oligonucleotides polymerase chain reaction. T-cell receptor status and oncogenetics were performed
 180 as previously described.

181

182

183

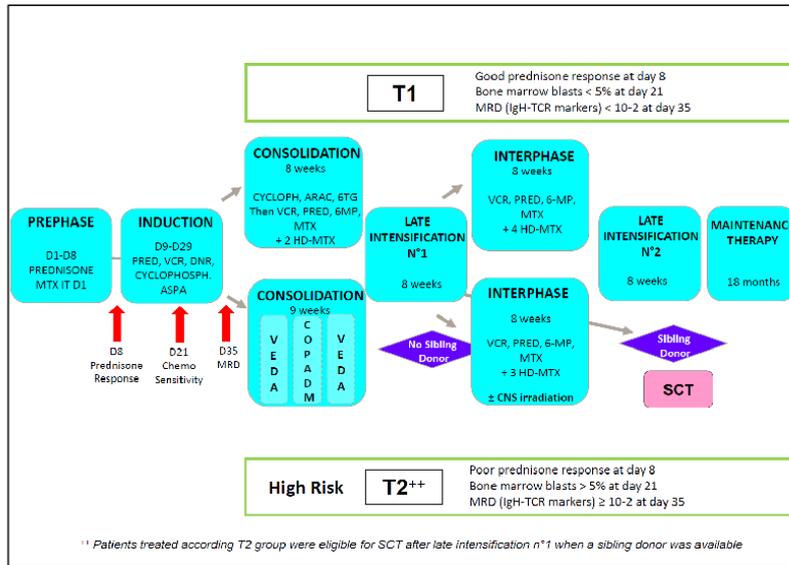
184

185

186

187 **SUPPLEMENTAL FIGURES**

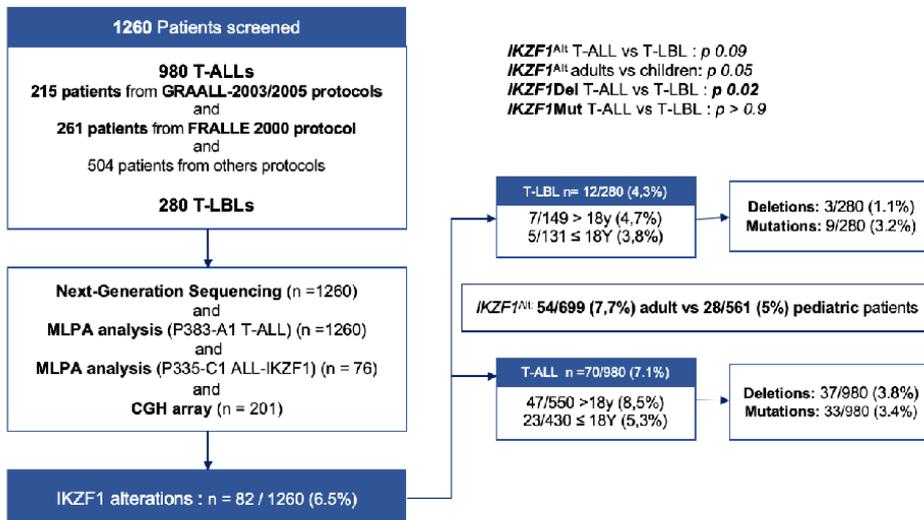
188 Supplemental Figure 1. General design of FRALLE 2000 T guidelines



189

190 Supplemental Figure 2.

191 Flow chart followed to screen a cohort of 1260 patients for IKZF1 deletions and mutations

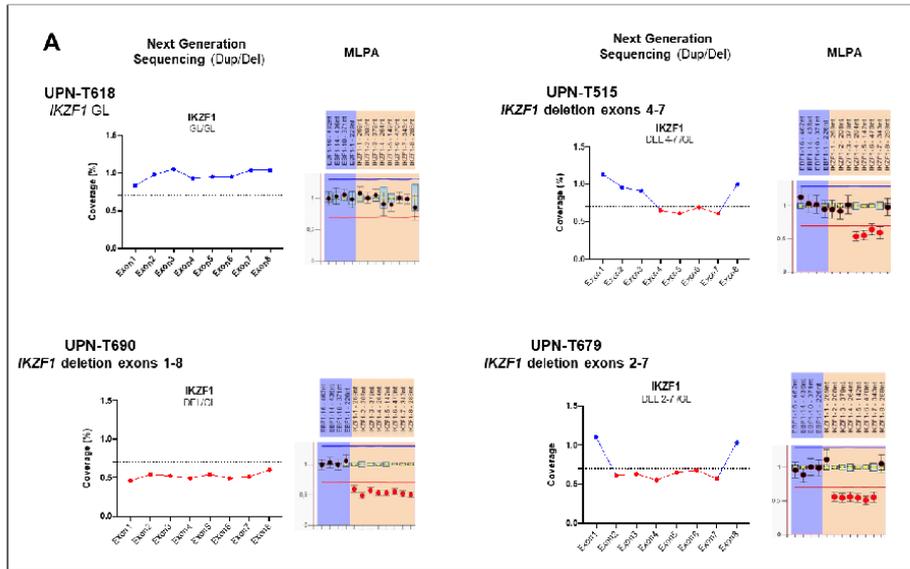


192

193

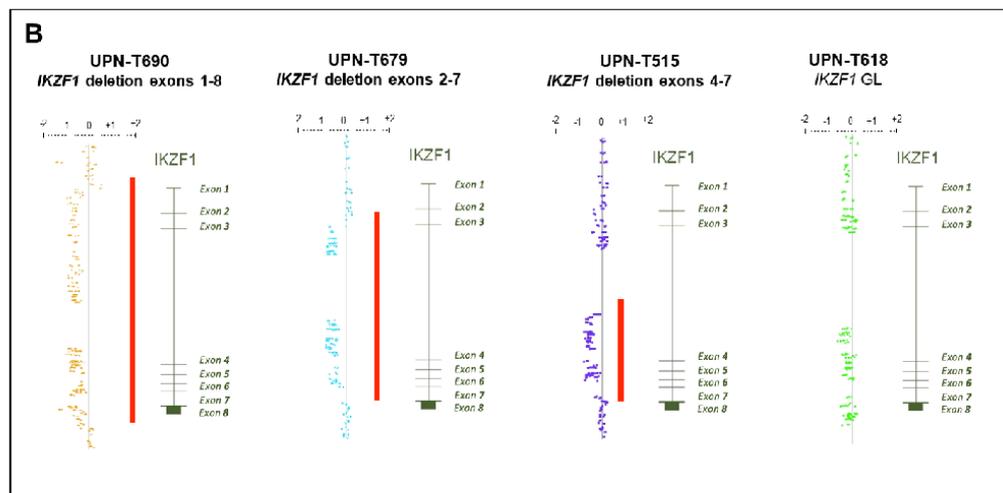
194 Supplemental Figure 3. IKZF1 mutational and deletion patterns by patient occurrence.

195 (A). *IKZF1* deletions as identified by MLPA analysis and NGS dupdel
 196 UPN-T690 patient harboring deletions of the entire *IKZF1* locus
 197 UPN-T679 and UPN-T515 patients harboring deletion of exons 2-7 and 4-7



198

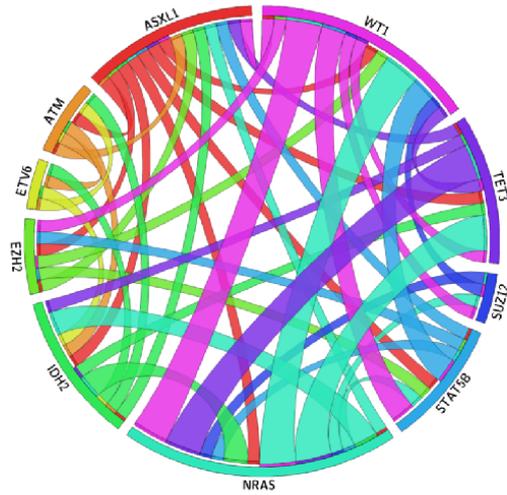
199 (B). *IKZF1* deletions as identified by CGH array.
 200 UPN-T690 patient harboring deletions of the entire *IKZF1* locus
 201 UPN-T679 and UPN-T515 patients harboring deletion of exons 2-7 and 4-7



202

203 **Supplemental Figure 4.** Genetic profiles of *IKZF1*^{Alt} T-ALL in the FRALLE and GRAALL 03-05 protocols.

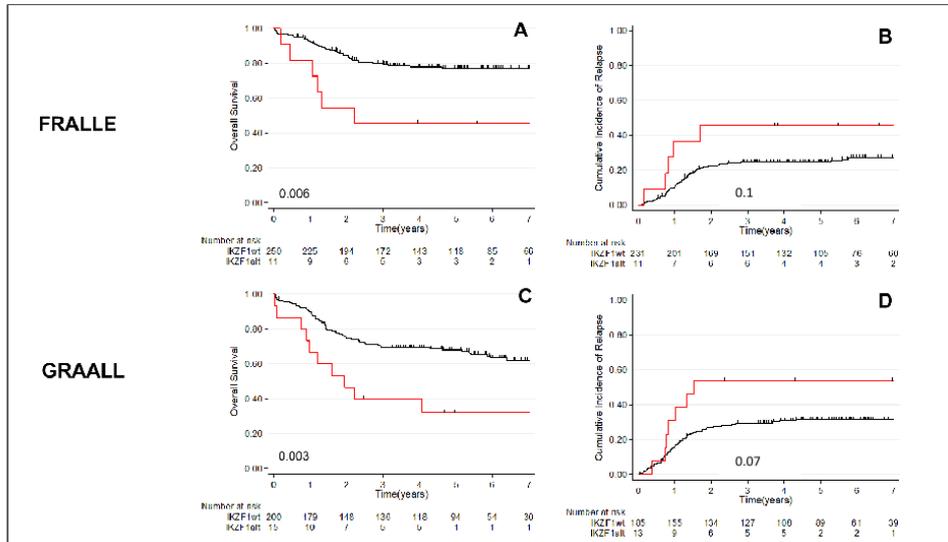
204 Circos plot of IKZF1Alt T-ALL pathway and gene interactions. Ribbons indicate co-occurring mutations
 205 between genes.



206

207 **Supplemental Figure 5.** *IKZF1*^{Alt} T-ALLs are associated with poor prognosis.

208 (A) OS and (B) CIR in FRALLE cohort - (C) OS and (D) CIR in GRAALL cohort



209

210 **Supplemental Figure 6.** *IKZF1* Deletions and *IKZF1* Mutations are associated with poor prognosis in T-
 211 ALL.

Supplemental Table 1:

Clinicobiologic characteristics of pediatric patients with T-ALL (FRALLE protocol) according to IKZF1 status

Characteristic	No (%) of Patients			p
	IKZF1 ^{Alt}	IKZF1 ^{GL}	Total	
Total	8 (3%)	253 (97%)	261 (100%)	
Clinical subsets analyzed				
Male sex	8 (100%)	197 (78%)	205 (78%)	0.2
Median age, years	8.4 [1.1;16.6]	9.4 [1.2;19.5]	9.3 [1.1;19.5]	0.9
Median WBC count (G/L)	120 [6;641]	100.5 [0.3;980]	100.5 [0.3;980]	0.9
CNS involvement	1	26 (10%)	27 (10%)	0.6
ETP classification	0/4 (0%)	15/121 (12%)	15/125 (12%)	0.9
T-cell receptor status	4	126	130	
Immature (IM0,IMδ,IMγ)	1	18 (14%)	19 (15%)	0.5
Cortical (IMB, preαβ)	1	65 (51%)	66 (50%)	0.5
Mature TCRαβ	2	23 (18%)	25 (20%)	0.1
Mature TCRγδ	0	20 (16%)	20 (15%)	0.9
Oncogenetics	7	208	215	
TLX1	0	9 (4%)	9 (4%)	0.9
TLX3	2	45 (22%)	47 (22%)	0.7
SIL-TAL1	0	39 (19%)	39 (18%)	0.4
HOXA positive	0/6	25/139 (18%)	25/145 (17%)	0.6
None of above	5 (71%)	111 (53%)	116 (54%)	0.5
N/F-R/P classifier	8	253	261	
High Risk classifier	6 (75%)	117 (46%)	123 (47%)	0.2
NOTCH1/FBXW7 ^{mut}	4 (50%)	167 (66%)	171 (65%)	0.5
K/N-RAS ^{mut}	3 (38%)	25 (10%)	29 (11%)	0.04 *
PTEN ^{altered}	0 (0%)	41 (16%)	41 (16%)	0.6
Treatment response				
CR	8/8 (100%)	234/253 (92%)	242/261 (93%)	0.9
CorticoR	4/8 (50%)	105/244 (43%)	109/252 (40%)	0.7
ChimioR	3/8 (38%)	34/245 (14%)	37/253 (15%)	0.1
MRD1≥10 ⁻⁴	5/8 (63%)	81/211 (38%)	86/219 (41%)	0.3
HSCT	2/8 (25%)	22/234 (9%)	24/242 (10%)	0.2
5-year CIR [95% CI]	% [;]	% [;]	% [;]	xxx
5-year OS [95% CI]	% [;]	% [;]	% [;]	xxx

Abbreviations: T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood count; CNS, central nervous system; ETP, early thymic precursor; N/F-R/P classifier, NOTCH1/FBXW7-RAS/PTEN classifier as previously described; ChR, chemoresistance; CR, complete remission; Ctr, corticoresistance; MRDA, minimal residual disease; CIR, cumulative incidence of relapse; OS, overall survival.

MRD1 correspond to MRD evaluation after induction and was performed by allele-specific oligonucleotides polymerase chain reaction. T-cell receptor status and oncogenetics were performed as previously described

Supplemental Table 2:

Clinicobiologic characteristics of adult patients with T-ALL (GRAALL protocol) according to IKZF1 status

Characteristic	No (%) of Patients			p
	IKZF1 ^{Alt}	IKZF1 ^{GL}	Total	
Total	12 (5.6%)	203 (94.5%)	215 (100%)	
Clinical subsets analyzed				
Male sex	8 (67%)	146 (72%)	154 (72%)	0.7
Median age, years	41.1 [23.3;59.1]	30.5 [16.3;59]	30.6 [16.3;59.2]	0.007 **
Median WBC count (G/L)	11 [2.8;394]	36.6 [0.9;645]	35.2 [0.9;645]	0.8
CNS involvement	2/12 (17%)	22/203 (11%)	24/215 (11%)	0.6
ETP classification	4/8 (50%)	36/174 (21%)	40/182 (22%)	0.07
T-cell receptor status	9	174	182	
Immature (IM0,IMδ,IMγ)	6 (67%)	43 (25%)	59 (27%)	0.01 *
Cortical (IMB, preαβ)	3 (33%)	90 (52%)	93 (51%)	0.4
Mature TCRαβ	0	20 (11%)	11 (11%)	0.6
Mature TCRγδ	0	20 (11%)	11 (11%)	0.6
Oncogenetics	11	188	199	
TLX1	1	44 (23%)	45 (23%)	0.4
TLX3	2	23 (12%)	25 (13%)	0.6
SIL-TAL1	0	18 (10%)	18 (9%)	0.6
HOXA positive	4/11 (24%)	49/173 (29%)	53 (29%)	0.7
None of above	7 (64%)	95 (51%)	102 (52%)	0.5
N/F-R/P classifier	12	203	216	
High Risk classifier	6 (50%)	84 (58%)	90 (42%)	0.5
NOTCH1/FBXW7 ^{mut}	10 (83%)	140 (69%)	150 (69%)	0.5
K/N-RAS ^{mut}	4 (33%)	17 (8%)	21 (10%)	0.02 *
PTEN ^{altered}	0	41 (20%)	41 (19%)	0.1
Treatment response				
CR	11/12 (92%)	187/203 (92%)	198/215 (92%)	0.9
CtR	6/12 (50%)	93/203 (46%)	99/215 (46%)	0.8
ChR	7/12 (58%)	86/202 (43%)	93/214 (43%)	0.3
MRD1≥10 ⁻⁴	5/6 (83%)	32/115 (28%)	37/121 (31%)	0.01 *
HSCT	3/12 (25%)	74/202 (37%)	77/214 (36%)	0.5
5-year CIR [95% CI]	% [;]	% [;]	% [;]	xxx
5-year OS [95% CI]	% [;]	% [;]	% [;]	xxx

Abbreviations: T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood count; CNS, central nervous system; ETP, early thymic precursor; N/F-R/P classifier, NOTCH1/FBXW7-RAS/PTEN classifier as previously described; ChR, chemoresistance; CR, complete remission; CtR, corticoresistance; MRD1, minimal residual disease; CIR, cumulative incidence of relapse; OS, overall survival. MRD1 correspond to MRD evaluation after induction and was performed by allele-specific oligonucleotides polymerase chain reaction. T-cell receptor status and oncogenetics were performed as previously described

Article 2. Impact pronostique des mutations d'*IDH1/2* dans les LAL-T

Dans ce travail publié en 2021 dans le *Journal of Hematology and Oncology* nous avons analysé l'impact pronostique associé à la présence des mutations d'*IDH1* et d'*IDH2* (*Isocitrate Dé-Hydrogénase 1/2*) dans les LAL-T.

Les mutations d'*IDH1* et d'*IDH2* sont des altérations récurrentes dans les leucémies aiguës myéloblastiques (15-20% des cas) et leur impact pronostique n'est pas clairement définis. De façon particulièrement intéressante les mutations affectant *IDH1* et *IDH2* sont des mutations responsables d'une modification de la fonction des enzymes IDH qui acquièrent la capacité de convertir l' α -cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate (2-HG). Le 2-HG (absent dans la cellule à l'état physiologique) se comporte comme un onco-métabolite et possède une activité d'inhibition des enzymes TET (TET2 et TET3) impliquées dans les processus de méthylation de l'ADN. On comprend ainsi que les mutations d'*IDH1/2* vont être responsables de modification épigénétique majeure participant aux différents processus d'oncogenèse. Il existe par ailleurs des inhibiteurs spécifiques des mutants d'*IDH1/2* (Ivosidenib et Enasidenib respectivement) qui ont été utilisés en clinique où ils ont présenté des résultats encourageants.

Dans les LAL-T, l'incidence et l'impact pronostique associé à ces mutations sont inconnues. Nous avons analysé l'incidence et l'impact des mutations d'*IDH1/2* au sein de notre cohorte de 476 LAL-T (261 pédiatriques et 215 adultes) ayant bénéficié d'un séquençage à haut débit sur un panel de plus de 60 gènes impliqués dans l'oncogenèse T. Nous avons confirmé que les mutations d'*IDH1/2* étaient rares dans les LAL-T (4% des patients) et fréquemment associées à d'autres altérations affectant des régulateurs épigénétiques comme les mutations de *DNMT3A* et *TET2*. D'un point de vue pronostique, il apparaissait que contrairement aux mutations d'*IDH1*, les mutations d'*IDH2* étaient associées à un pronostic défavorable qui pourrait justifier de proposer un inhibiteur spécifique chez ces patients en situation de rechute ou de maladie réfractaire.

Article II

Titre :

Oncogenetic landscape and clinical impact of IDH1 and IDH2 mutations in T-ALL

Co-auteurs :

Mathieu Simonin, Aline Schmidt, Christophe Bontoux, Marie-Émilie Dourthe, Etienne Lengliné, Guillaume P Andrieu, Ludovic Lhermitte, Carlos Graux, Nathalie Gardel, Jean-Michel Cayuela, Françoise Huguet, Isabelle Arnoux, Stéphane Ducassou, Elizabeth Macintyre, Virginie Gandemer, Hervé Dombret, Arnaud Petit, Norbert Ifrah, André Baruchel, Nicolas Boissel, Vahid Asnafi

État de article :

Publié

Nom de la revue :

Journal of Hematology and Oncology

Année de Publication :

2021

RAPID COMMUNICATION

Open Access



Oncogenetic landscape and clinical impact of *IDH1* and *IDH2* mutations in T-ALL

Mathieu Simonin^{1,2,3}, Aline Schmidt⁴, Christophe Bontoux^{1,3}, Marie-Émilie Dourthe^{1,3,5}, Etienne Lengliné⁶, Guillaume P. Andrieu^{1,3}, Ludovic Lhermitte^{1,3}, Carlos Graux⁷, Nathalie Gardel^{8,9}, Jean-Michel Cayuela¹⁰, Françoise Huguet¹¹, Isabelle Arnoux¹², Stéphane Ducassou¹³, Elizabeth Macintyre^{1,3}, Virginie Gandemer¹⁴, Hervé Dombret⁶, Arnaud Petit², Norbert Ifrah⁴, André Baruchel⁵, Nicolas Boissel⁶ and Vahid Asnafi^{1,3*}

Abstract

IDH1 and *IDH2* mutations (*IDH1/2*^{Mut}) are recognized as recurrent genetic alterations in acute myeloid leukemia (AML) and associated with both clinical impact and therapeutic opportunity due to the recent development of specific *IDH1/2*^{Mut} inhibitors. In T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), their incidence and prognostic implications remain poorly reported. Our targeted next-generation sequencing approach allowed comprehensive assessment of genotype across the entire *IDH1* and *IDH2* locus in 1085 consecutive unselected and newly diagnosed patients with T-ALL and identified 4% of, virtually exclusive (47 of 49 patients), *IDH1/2*^{Mut}. Mutational patterns of *IDH1/2*^{Mut} in T-ALL present some specific features compared to AML. Whereas *IDH2*^{R140Q} mutation was frequent in T-ALL (25 of 51 mutations), the *IDH2*^{R172} AML hotspot was absent. *IDH2* mutations were associated with older age, an immature phenotype, more frequent *RAS* gain-of-function mutations and epigenetic regulator loss-of-function alterations (*DNMT3A* and *TET2*). *IDH2* mutations, contrary to *IDH1* mutations, appeared to be an independent prognostic factor in multivariate analysis with the *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* classifier. *IDH2*^{Mut} were significantly associated with a high cumulative incidence of relapse and very dismal outcome, suggesting that *IDH2*-mutated T-ALL cases should be identified at diagnosis in order to benefit from therapeutic intensification and/or specific *IDH2* inhibitors.

Keywords: *IDH1*, *IDH2*, T-ALL

Introduction

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is aggressive neoplasms resulting from the proliferation of T-lymphoid progenitors blocked at thymic stages of differentiation and account for 15% and 25% of pediatric and adult ALLs, respectively [1]. T-ALL is associated with a wide range of acquired genetic abnormalities that contribute to developmental arrest and abnormal proliferation [2]. Although intensive treatment protocols

have markedly improved the outcomes of children with T-ALL, cure rates remain below 60% for adults and 85% for children [3–5]. The prognosis is particularly poor in relapsing patients, justifying the development of novel targeted therapies [6, 7]. For example, alterations affecting epigenetic factors may offer novel targeted therapeutic approaches in high-risk T-ALL [8].

Whole-genome sequencing of AML identified acquired mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (*IDH1/2*) [9]. These paralogous genes encode two enzymes with distinct localizations (cytoplasmic for *IDH1* and mitochondrial for *IDH2*). Both catabolize the conversion of isocitrate to α -ketoglutarate (α -KG). Gain-of-function *IDH1/2* mutations (*IDH1/2*^{Mut}) confer a neomorphic activity on the encoded enzymes, leading to the

*Correspondence: vahid.asnafi@aphp.fr

¹ Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker Enfants-Malades, Université de Paris, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

conversion of α -KG to 2-hydroglutarate (2-HG) in a NAD phosphate-dependent manner [10]. Accumulation of the oncometabolite 2-HG induces multiple cellular alterations, including chromatin methylation and cellular differentiation, by inhibiting α -KG-dependent enzymes related to DNA methylation, such as Tet oncogene family members (TET2, TET3) [11]. *IDH1/2^{Mut}* have been reported in 10 to 20% of AML cases, when they are predominantly located in the active site of the enzyme (*IDH1^{R132}*, *IDH2^{R140Q}* and *IDH2^{R172}*). *IDH1/2^{Mut}* in AML are associated with prognostic impact influenced by the genetic context [12, 13]. Importantly, specific drugs targeting mutant *IDH1* or *IDH2* have recently shown promise in *IDH1/2^{Mut}* refractory or relapsed AML patients [14, 15].

In T-ALL, *IDH1/2^{Mut}* have been partially explored and their prognostic impact poorly reported [16, 17]. We now provide the first comprehensive analysis and oncogenic landscape of *IDH1/2^{Mut}* in a cohort of 1085 T-ALL patients, when the nearly 4% of *IDH1/2^{Mut}* are associated with extremely poor prognosis, specifically in *IDH2*-mutated cases.

Methods

Patient's protocol and clinical trials

Diagnostic peripheral blood or bone marrow samples from 1085 adults and children with T-ALL were analyzed after informed consent was obtained at diagnosis according to the Declaration of Helsinki. Among the 1085 T-ALL analyzed, 215 adult patients aged from 16–59 years were included in the GRAALL03/05 trials (details provide in supplementary) which were registered at clinicaltrials.gov (GRAALL-2003, #NCT00222027; GRAALL-2005, #NCT00327678). and 261 pediatric patients aged from 1 to 19 years were treated in 10 French pediatric hematology departments, members of the FRALLE study group, according to the FRALLE 2000 T guidelines (Additional file 2: Fig. S5 and Additional file 1: Table S3).

Gene mutation screening

A custom capture Nextera XT gene panel (Illumina, San Diego, CA) targeting all coding exons and their adjacent splice junctions of 80 genes was designed, based on available evidence in hematological neoplasms (Additional file 1: Table S1). DNA Libraries were prepared using Nextera Rapid Capture Enrichment protocol and underwent 2 × 150 bp paired-end sequencing on Illumina MiSeq sequencing system with MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). Briefly, sequence reads were filtered and mapped to the human genome (GRCh37/hg19) using in-house software (Polyweb, Institut Imagine, Paris). Annotated variants were

selected after filtering out calls according to the following criteria: (1) coverage < 30×, < 10 alternative reads or variant allelic fraction (VAF) < 7%; (2) polymorphisms described in dbSNP, 1000Genomes, EVS, Gnomad and EXAC with a calculated mean population frequency > 0.1%. Non-filtered variants were annotated using somatic database COSMIC (version 78) and ProteinPaint (St Jude Children's Research Hospital – Pediatric Cancer data portal). Lollipop plots were generated with ProteinPaint (<https://pecan.stjude.org/#/proteinpaint>).

Immunophenotypic and molecular characterization of T-ALL samples

Peripheral blood or bone marrow T-ALL samples were analyzed for immunophenotype, fusion transcripts (SIL-TAL1, CALM-AF10), oncogenic transcripts (HOXA9, TLX1 and TLX3) and T-cell receptor (TCR) recombination and *NOTCH1/FBXW7/RAS/P TEN* mutations, as previously described [4, 18, 19].

Minimal residual disease assessment

Immunoglobulin/T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangement-based Minimal Residual Disease (MRD) evaluation was centrally assessed for patients who reached complete remission after the first induction cycle, on BM samples after induction (MRD1). MRD was centrally assessed by real-time quantitative allele-specific oligonucleotide PCR and interpreted according to EuroMRD group guidelines [20–22].

Statistical analysis

Comparisons for categorical and continuous variables between *IDH1^{Mut}* or *IDH2^{Mut}* and *IDH^{WT}* subgroups were performed with Fisher's exact test and Mann–Whitney test, respectively. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis to the last follow-up date censoring patients alive. The cumulative incidence of relapse (CIR) was calculated from the complete remission date to the date of relapse censoring patients alive without relapse at the last follow-up date. Relapse and death in complete remission were considered as competitive events. Univariate and multivariate analyses assessing the impact of categorical and continuous variables were performed with a Cox model. Proportional-hazards assumption was checked before conducting multivariate analyses. In univariate and multivariate analyses, age and log₁₀(WBC) were considered as continuous variables. All analyses were stratified on the trial. Variables with a *p* value less than 0.1 in univariate analysis were included in the multivariable models. Statistical analyses were performed with STATA software (STATA 12.0 Corporation,

College Station, TX). All p-values were two-sided, with $p < 0.05$ denoting statistical significance. Circos plots were generated using R software.

Results and discussion

Incidence of *IDH1* and *IDH2* mutations in 1085 T-ALL
 A total of 51 (4%) mutations, mainly clonal, in either *IDH1* or *IDH2* were apparent in 49 cases (Fig. 1a and Additional file 1: Table S2, Additional file 2: Figs. S2,

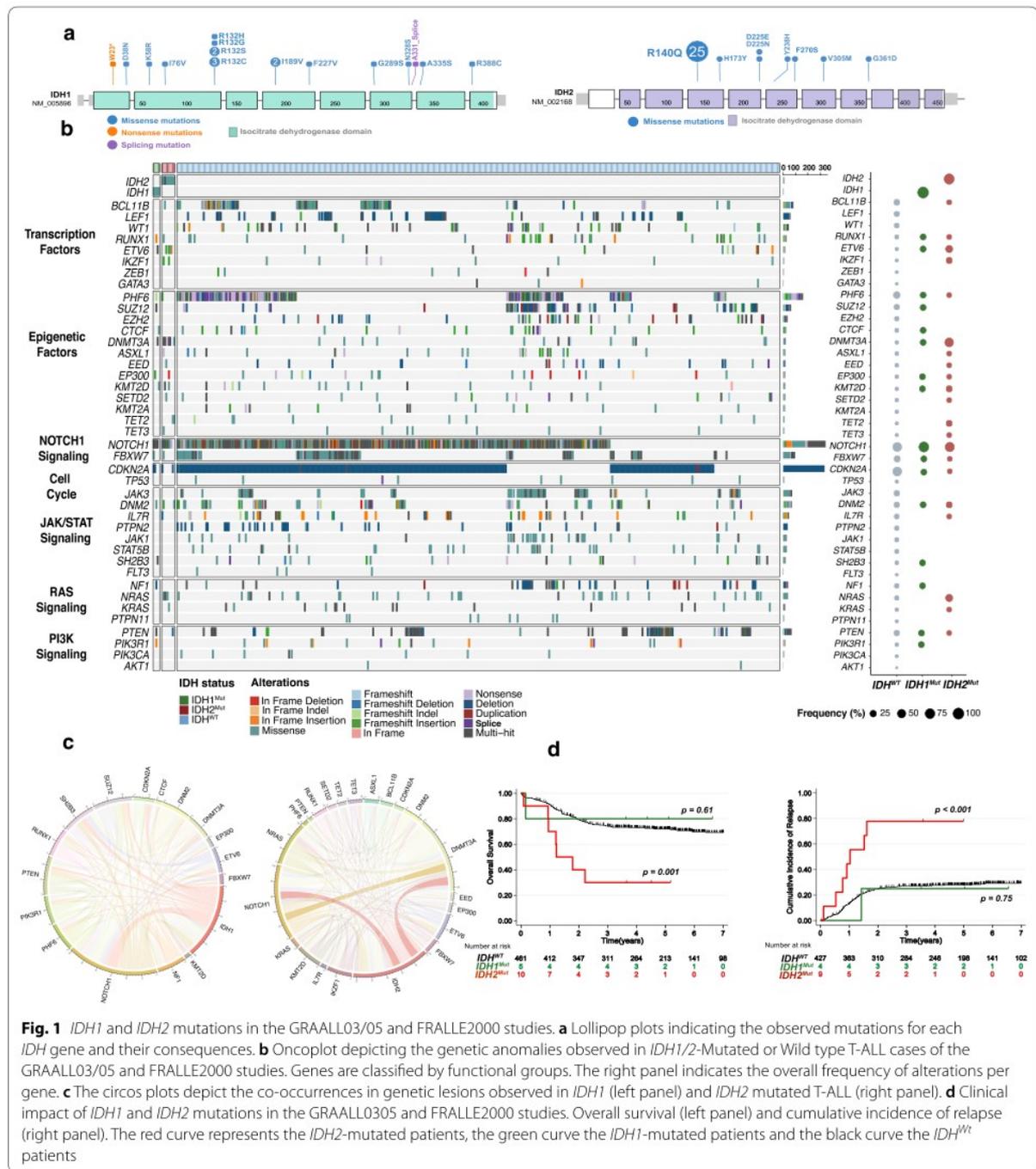


Fig. 1 *IDH1* and *IDH2* mutations in the GRAALL03/05 and FRALLE2000 studies. **a** Lollipop plots indicating the observed mutations for each *IDH* gene and their consequences. **b** Oncoplot depicting the genetic anomalies observed in *IDH1/2*-Mutated or Wild type T-ALL cases of the GRAALL03/05 and FRALLE2000 studies. Genes are classified by functional groups. The right panel indicates the overall frequency of alterations per gene. **c** The circos plots depict the co-occurrences in genetic lesions observed in *IDH1* (left panel) and *IDH2* mutated T-ALL (right panel). **d** Clinical impact of *IDH1* and *IDH2* mutations in the GRAALL0305 and FRALLE2000 studies. Overall survival (left panel) and cumulative incidence of relapse (right panel). The red curve represents the *IDH2*-mutated patients, the green curve the *IDH1*-mutated patients and the black curve the *IDH*^{WT} patients

S3). *IDH1* mutations were identified in 19 T-ALL cases (2%) and *IDH2* mutations in 32 cases (3%). *IDH1/2^{Mut}* were mutually exclusive except in 2 cases. The *IDH2^{R140Q}* mutation was the most prevalent mutation affecting *IDH2* ($n=25$, 78%). We identified 7 *IDH1* mutations located in the R132 hotspot (37% of *IDH1* mutations), 3 cases with *IDH1^{R132C}* mutation, 2 with *IDH1^{R132S}*, 1 with *IDH1^{R132H}* and *IDH1^{R132G}* mutation. The most common *IDH2* mutations in AML occur at R140 followed by residue *IDH2^{R172}*. The latter mutation is virtually the only *IDH* mutation found in angio-immunoblastic T cell lymphoma, reported in about 30% of cases (Additional file 2: Fig. S1) [23]. *IDH2^{R172}* mutation has also been rarely and inconsistently described in peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified (NOS) with T-follicular helper (T_{FH}) phenotype [24, 25]. In striking contrast, *IDH2^{R172}* was not reported in our series of T-ALL. *IDH1^{R132}*, the most frequent *IDH1* mutation reported in our cohort, has recently been recognized to cooperate with NOTCH1 activation in a T-ALL mouse model [26]. These results highlight the specific consequence associated with *IDH1/2^{Mut}* subtype during immature T-cell development.

Clinico-biological characteristics of *IDH1/2^{Mut}* in GRAALL and FRALLE-treated T-ALLs

We then investigated the clinical characteristics linked to *IDH1/2^{Mut}* in a subset of 476 patients, including 215 adults enrolled in the GRAALL-2003/2005 trials and 261 children enrolled in the FRALLE-2000 trial (Table 1 and Supplemental Methods). The incidence of *IDH1/2^{Mut}* in this cohort was 3% (15/476). *IDH1* mutations were detected in 5 patients (4 adult and 1 pediatric case), and *IDH2* mutations were identified in 10 (6 adult and 4 pediatric cases) (Additional file 2: Fig. S2). *IDH2^{R140Q}* was the most frequent mutation ($n=7$, 70%) and was most prevalent in adults' patients ($n=6/7$, 86%). Overall, *IDH1/2^{Mut}* were observed in 5% of adults and 2% of children ($p=0.1$).

IDH1 and *IDH2* mutations are associated with both specific clinical and mutational profiles

Patients with *IDH2^{Mut}* were significantly older than *IDH^{WT}* (median 47.6 years vs 15.0, $p=0.01$). *IDH2^{Mut}* were associated with an immature immunophenotype (5/7, 71% vs 83/407, 20%, $p=0.006$) and ETP-phenotype (3/5, 60% vs 52/298, 17%, $p=0.04$). In line with this, *IDH2^{Mut}* correlated positively with abnormalities known to be associated with an immature phenotype, including *RAS* (50% vs 11%, $p=0.02$), *ETV6* (40% vs 3%, $p<0.01$), *DNMT3A* (70% vs 3%, $p<0.01$), *IKZF1* (20% vs 2%, $p=0.02$) and *TET2* (20% vs 2%, $p=0.04$) mutations (Fig. 1b, c). *IDH2^{Mut}* were mutually exclusive with *SIL-TAL1+* cases, associated with a mature TCR $\alpha\beta$ lineage.

Interestingly, contrary to *IDH2*-mutated cases, *IDH1^{Mut}* did not statistically differ from *IDH^{WT}* patient regarding age, immunophenotype or mutational co-occurrence.

IDH2 mutations, but not *IDH1*, are associated with a poor prognosis in T-ALL

To investigate the prognostic value of *IDH1/2^{Mut}*, survival analyses were performed on the 476 patient cohort. *IDH1/2^{Mut}* cases did not differ significantly with regard to sex, white blood cell count (WBC) or central nervous system (CNS) involvement (Table 1). Despite an initial good treatment response (*IDH2^{Mut}* cases achieved 90% complete remission rate and *IDH2^{Mut}* did not confer increased poor prednisone response), patients with *IDH2^{Mut}* had an inferior outcome compared to *IDH2^{WT}* (Table 1, Fig. 1d, Additional file 2: Fig. S4), with an increased cumulative incidence of relapse (CIR) (4y-CIR: 78% vs 29%; specific hazard ratio (SHR) 4.3, 95%CI (2.0–9.2); $p<0.001$) and a shorter overall survival (OS) (4y-OS: 30% vs 71%; hazard ratio: 3.6, 95%CI (1.7–7.7); $p=0.001$). In multivariate analysis considering variables associated with CIR and OS in univariate analyses as covariates, *IDH2^{Mut}* predicted a trend for lower OS (HR: 1.98, 95%CI (0.86–4.57); $p=0.11$) and statistically higher CIR (SHR, 4.06, 95%CI (1.84–8.96), $p=0.001$) even after adjustment on the 4-gene *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* (*NFRP*) classifier which identified poor prognosis patients in both GRAALL and FRALLE trials [3, 4]. Conversely to *IDH2^{Mut}*, *IDH1^{Mut}* was not associated with poor prognostic impact in T-ALL (4y-CIR: 25% vs 29%, $p=0.75$ and 4y-OS: 80% vs 71%, $p=0.61$).

We provide the largest comprehensive analysis of *IDH1* and *IDH2* mutations in T-ALL and highlight for the first time both their clinical profile and, most importantly, the extremely poor prognosis impact associated with *IDH2^{Mut}*. We describe the specific oncogenetic landscape of *IDH1/2^{Mut}* and interestingly report that *IDH2^{Mut}* T-ALL conversely to *IDH1^{Mut}* were associated with an immature phenotype and alterations such as *RAS* mutations, transcription factors alterations (*ETV6*, *IKZF1*) and epigenetic regulators alterations (*TET2*, *DNMT3A*).

Recent studies have shed light on new prognostic factor in T-ALL allowing sharper prediction of the risk of relapse (e.g., *NFRP* classifier, level of MRD1, *IKZF1* alterations) [3, 4, 27]. Despite this, a significant number of T-ALL relapses remain unpredicted, so new predictive markers are needed, given the extremely poor prognosis associated with T-ALL relapse. We therefore consider that *IDH2^{Mut}* T-ALL cases should be identified at diagnosis to benefit from therapeutic intensification and/or specific *IDH2^{Mut}* inhibitors [15].

Table 1 Clinico-biological and outcome characteristics of adult and pediatric T-ALL (GRAALL and FRALLE protocols) according to *IDH1/2* status

Variable	<i>IDH2^{Mut}</i> (n = 10)	p value ²	Overall (n = 476)	p value ²	<i>IDH1^{Mut}</i> (n = 5)
Male	7/10 (70%)	0.72	357/476 (75%)	0.34	5/5 (100%)
Age (y) ¹	47.6 (3.6–59.1)	0.01	15.3 (1.1–59.1)	0.26	21.6 (5.4–56.5)
WBC (G/L) ¹	9 (1–400)	0.01	64 (0–980)	0.60	80 (4–110)
CNS involvement	1/10 (10%)	0.99	51/474 (11%)	0.99	0/5 (0%)
<i>Immunophenotype</i>					
ETP phenotype	3/5 (60%)	0.04	56/307 (18%)	0.54	1/4 (25%)
Immature (IM0/δ/γ)	5/7 (71%)	0.006	89/419 (21%)	0.99	1/5 (20%)
Cortical (IMB, preαβ)	0/7 (0%)	0.007	211/419 (50%)	0.68	2/5 (40%)
Mature TCRαβ	1/7 (14%)	0.99	66/419 (16%)	0.99	0/5 (0%)
Mature TCRγδ	1/7 (14%)	0.99	53/419 (13%)	0.12	2/5 (40%)
<i>Oncogenetic classification</i>					
<i>TLX1</i>	0/8 (0%)	0.60	54/415 (13%)	0.99	0/5 (0%)
<i>TLX3</i>	1/8 (12%)	0.99	72/415 (17%)	0.21	2/5 (40%)
<i>SIL-TAL1</i>	0/8 (0%)	0.61	57/415 (14%)	0.99	0/5 (0%)
<i>CALM-AF10</i>	0/8 (0%)	0.99	13/415 (3%)	0.99	0/5 (0%)
High-risk classifier	8/10 (80%)	0.03	209/476 (44%)	0.99	2/5 (40%)
<i>Treatment response</i>					
Rapid prednisone response	3/10 (30%)	0.12	259/467 (55%)	0.66	2/5 (40%)
Complete Remission	9/10 (90%)	0.54	440/476 (92%)	0.32	4/5 (80%)
MRD1 > 10 ⁻⁴	1/1 (100%)	0.36	123/340 (36%)	0.99	1/4 (25%)
Allo-HSCT	2/10 (20%)	0.99	101/456 (22%)	0.99	1/5 (20%)
<i>Outcome</i>					
4-year CIR (95% CI)	78% (49;97)	< 0.001³	29% (25;33)	0.75 ³	25% (4;87)
4-year OS (95% CI)	30% (7;58)	0.001³	71% (67;75)	0.61 ³	80% (20;97)

Univariate and multivariate analysis³

CIR	Univariate			Multivariate		
	SHR	95%CI	p	SHR	95%CI	p
Age	1.01	(0.98; 1.03)	0.57	-	-	-
CNS	1.57	(0.85; 2.59)	0.08	1.33	(0.80; 2.20)	0.28
Log(WBC)	1.62	(1.2; 2.18)	0.002	1.63	(1.20; 2.22)	0.002
Prednisone response	0.67	(0.47; 0.95)	0.03	1.00	(0.68; 1.46)	0.99
High-risk Classifier	2.78	(1.94; 3.99)	< 0.001	2.62	(1.81; 3.79)	< 0.001
<i>IDH2^{Mut}</i>	4.28	(1.99; 9.23)	< 0.001	4.06	(1.84; 8.96)	0.001
OS	HR	95%CI	p	HR	95%CI	p
Age	1.03	(1.01; 1.05)	0.001	1.04	(1.02; 1.07)	< 0.001
CNS	2.00	(1.28; 3.14)	0.002	1.67	(1.02; 1.07)	0.03
Log(WBC)	1.99	(1.48; 2.67)	< 0.001	2.00	(1.46; 2.76)	< 0.001
Prednisone response	0.54	(0.38; 0.76)	< 0.001	0.85	(0.59; 1.24)	0.41
High-risk Classifier	2.93	(2.06; 4.17)	< 0.001	2.90	(2.00; 4.19)	< 0.001
<i>IDH2^{Mut}</i>	3.56	(1.66; 7.65)	0.001	1.98	(0.86; 4.57)	0.11

p-values < 0.05 are indicated in bold

MRD1 correspond to MRD evaluation after induction and was performed by allele-specific oligonucleotides polymerase chain reaction. T-cell receptor status and oncogenic were performed as described in supplemental methods. *IDH1^{Mut}* and *IDH2^{Mut}* were statistically compared to *IDH1^{WT}* and *IDH2^{WT}* patients, respectively

T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood count; CNS, central nervous system; ETP, early thymic precursor; High Risk classifier, *NOTCH1/FBXW7-RAS/PTEN* classifier as previously described [3, 4]; CR, complete remission; MRD, minimal residual disease; Allo-HSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; CIR, cumulative incidence of relapse; OS, overall survival; HR: hazard ratio, SHR: specific hazard ratio, CI: confidence interval

¹ Statistics presented: Median (Minimum–Maximum)

² Statistical tests performed: Fisher's exact test; Wilcoxon rank-sum test

³ Univariate and multivariate Cox analyses stratified on protocol

Abbreviations

IDH1/2^{Mut}: *IDH1-IDH2* Mutations; AML: Acute myeloid leukemia; T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia; *NFRP*: *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN*; CNS: Central nervous system; WBC: White blood cell count; NOS: Not otherwise specified; *T_{FH}*: T-Follicular helper; ETP: Early thymic precursor; MRD: Minimal residual disease.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01068-4>.

Additional file 1. Supplemental Table 1: Custom capture Nextera XT gene panel. **Supplemental Table 2:** *IDH1* and *IDH2* mutations identified in 1085 patients with T-ALL. **Supplemental Table 3:** Chemotherapy in the FRALLE 2000 standard risk group T1 and high risk T2.

Additional file 2. Figure S1: Lollipop plots indicating the observed mutations for *IDH1* and *IDH2* in the present series confront with Cosmic-reported mutations for AML and AITL. **Figure S2:** Lollipop plots indicating the observed mutations for *IDH1* and *IDH2* affecting patients included in FRALLE and GRAALL protocol. **Figure S3:** Variant Allele Frequency (VAF) of individual *IDH1* and *IDH2* mutations observed in 1085 T-ALL. **Figure S4:** OS and CIR according to the *IDH1* or *IDH2^{Mut}* status in the two subgroups (FRALLE and GRALL 03/05). **Figure S5:** General design of FRALLE 2000 T guidelines.

Acknowledgements

The authors would like to thank all participants in the GRAALL-2003 and GRAALL-2005 study groups, the SFCE and the investigators of the 16 SFCE centers involved in collection and provision of data and patient samples, and V. Lheritier for collection of clinical data.

Authors' contributions

N.B, V.A and M.S conceived the study and oversaw the project; M.S, A.S, C.B, M.E.D, E.L, C.G, N.G, J.M.C, I.A, V.G, F.H, S.D, N.I, H.D, A.B, A.P, N.B provided study materials or patients; M.S, C.B, A.S, E.M, G.P.A and V.A performed molecular analyses; M.S, A.S, C.B, V.A. collected and assembled data; N.B and M.S performed statistical analysis; M.S, A.S, C.B, V.A, N.B, G.P.A analyzed and interpreted data; M.S, N.B, A.S, C.B, E.M, V.A wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The GRAALL was supported by grants P0200701 and P030425/AOM03081 from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique, Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, France and the Swiss Federal Government in Switzerland. Samples were collected and processed by the AP-HP "Direction de Recherche Clinique" Tumor Bank at Necker-Enfants Malades. MS was supported by « Action Leucémie » and « Soutien pour la formation à la recherche translationnelle en cancérologie dans le cadre du Plan cancer 2009–2013 ». This work was supported by grants to Necker laboratory from the "Association Laurette Fugain", Association pour la Recherche contre le Cancer (Equipe labellisée), Institut National du Cancer PRT-K 18–071 and the Fédération Leucémie espoir and Horizon Hemato.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations**Ethics approval and consent to participate**

Studies were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by local and multicenter research ethical committees.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author details

¹Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker-Enfants-Malades, Université de Paris, 149 rue de Sévres, 75015 Paris, France. ²Department of Pediatric Hematology and Oncology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Armand Trousseau Hospital, Sorbonne Université, Paris, France. ³Institut Necker-Enfants Malades (INEM), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1151, Paris, France. ⁴PRES LUNAM, CHU Angers service des Maladies du Sang, INSERM U 892, Angers, France. ⁵Department of Pediatric Hematology and Immunology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Robert Debré Hospital, University Paris Diderot, Paris, France. ⁶Université Paris Diderot, Institut Universitaire d'Hématologie, EA-3518, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, University Hospital Saint-Louis, Paris, France. ⁷Department of Hematology, Université Catholique de Louvain, CHU UCL Namur - site Godinne, Yvoir, Belgium. ⁸Laboratory of Hematology, CHRU - Inserm U1172, Lille, France. ⁹Inserm U1172, Lille Cedex, France. ¹⁰Laboratory of Hematology, Saint-Louis Hospital, AP-HP, Paris, France. ¹¹Department of Hematology, CHRU - Institut Universitaire de Cancer Toulouse - Oncopole, Toulouse, France. ¹²Laboratory of Hematology, Marseille University Hospital Timone, Marseille, France. ¹³Pediatric Hematology-Oncology Department, Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Bordeaux, France. ¹⁴Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital of Rennes, Rennes, France.

Received: 2 February 2021 Accepted: 25 March 2021

Published online: 03 May 2021

References

- Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015;373:1541–52.
- Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood*. 2017;129:1113–23.
- Petit A, Trinquand A, Chevret S, Ballerini P, Cayuela J-M, Grardel N, et al. Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2018;131:289–300.
- Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, Lambert J, Beldjord K, Lengliné E, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J Clin Oncol*. 2013;31:4333–42.
- Gökbuğut N, Kneba M, Raff T, Trautmann H, Bartram C-R, Arnold R, et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*. 2012;120:1868–76.
- Gökbuğut N, Stanze D, Beck J, Diedrich H, Horst H-A, Hüttmann A, et al. Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood*. 2012;120:2032–41.
- Desjonquères A, Chevallier P, Thomas X, Huguet F, Leguay T, Bernard M, et al. Acute lymphoblastic leukemia relapsing after first-line pediatric-inspired therapy: a retrospective GRAALL study. *Blood Cancer J*. 2016;6:e504.
- Van der Meulen J, Van Roy N, Van Vlierberghe P, Speleman F. The epigenetic landscape of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;53:547–57.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009;361:1058–66.
- Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, et al. The common feature of leukemia-associated *IDH1* and *IDH2* mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010;17:225–34.

11. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 2012;483:474–8.
12. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Gardin C, Reman O, Contentin N, et al. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol*. 2010;28:3717–23.
13. DiNardo CD, Ravandi F, Agresta S, Konopleva M, Takahashi K, Kadia T, et al. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am J Hematol*. 2015;90:732–6.
14. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, et al. Durable remissions with ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med*. 2018;378:2386–98.
15. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130:722–31.
16. Van Vlierberghe P, Ambesi-Impiombato A, Perez-Garcia A, Haydu JE, Rigo I, Hadler M, et al. ETV6 mutations in early immature human T cell leukemias. *J Exp Med*. 2011;208:2571–9.
17. Van Vlierberghe P, Ambesi-Impiombato A, De Keersmaecker K, Hadler M, Paietta E, Tallman MS, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013;122:74–82.
18. Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, Comba B, Le Tutour P, Estienne M-H, 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;101:2693–703.
19. Bond J, Marchand T, Touzart A, Cieslak A, Trinquand A, Sutton L, et al. An early thymic precursor phenotype predicts outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *Haematologica*. 2016;101:732–40.
20. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26:1908–75.
21. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*. 1998;12:2006–14.
22. van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21:604–11.
23. Lemonnier F, Cairns RA, Inoue S, Li WY, Dupuy A, Broutin S, et al. The IDH2 R172K mutation associated with angioimmunoblastic T-cell lymphoma produces 2HG in T cells and impacts lymphoid development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:15084–9.
24. Heavican TB, Bouska A, Yu J, Lone W, Amador C, Gong Q, et al. Genetic drivers of oncogenic pathways in molecular subgroups of peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2019;133:1664–76.
25. Watatani Y, Sato Y, Miyoshi H, Sakamoto K, Nishida K, Gion Y, et al. Molecular heterogeneity in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified revealed by comprehensive genetic profiling. *Leukemia*. 2019;33:2867–83.
26. Hao Z, Cairns RA, Inoue S, Li WY, Sheng Y, Lemonnier F, et al. Idh1 mutations contribute to the development of T-cell malignancies in genetically engineered mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:1387–92.
27. Simonin M, Lhermitte L, Dourthe M-E, Lengline E, Graux C, Gardel N, et al. IKZF1 alterations predict poor prognosis in adult and pediatric T-ALL. *Blood*. 2020. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007959>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



SUPPLEMENTAL DATA

Oncogenetic Landscape and Clinical Impact of *IDH1* and *IDH2* Mutations in T-ALL

1- SUPPLEMENTAL METHODS

- Patient's protocol and clinical trials
- Immunophenotypic and molecular characterization of T-ALL samples
- Minimal residual disease assessment
- Gene mutation screening
- Statistical analysis

2- SUPPLEMENTAL TABLES

- Supplemental **Table 1**: Custom capture Nextera XT gene panel
- Supplemental **Table 2**: *IDH1* and *IDH2* mutations identified in 1085 patients with T-ALL
- Supplemental **Table 3**: Chemotherapy in the FRALLE 2000 standard risk group T1 and high risk T2

3- SUPPLEMENTAL FIGURES

- Supplemental **Figure 1**: Lollipop plots indicating the observed mutations for *IDH1* and *IDH2* in the present series confront with Cosmic-reported mutations for AML and AITL
- Supplemental **Figure 2**: Lollipop plots indicating the observed mutations for *IDH1* and *IDH2* affecting patients included in FRALLE and GRAALL protocol
- Supplemental **Figure 3**: VAF of individual *IDH1* and *IDH2* mutations observed in 1085 T-ALL
- Supplemental **Figure 4**: OS and CIR in the two subgroups (FRALLE and GRALL 03/05)
- Supplemental **Figure 5**: General design of FRALLE 2000 T guidelines

4- SUPPLEMENTAL REFERENCES

1- SUPPLEMENTAL METHODS

Patient's protocol and clinical trials

Diagnostic peripheral blood or bone marrow samples from 1085 adults and children with T-ALL were analyzed after informed consent was obtained at diagnosis according to the Declaration of Helsinki.

Adult patients aged from 16-59 years, were included in the GRAALL03/05 trials (details provide in supplementary pdf file) which were registered at clinicaltrials.gov (GRAALL-2003, #NCT00222027; GRAALL-2005, #NCT00327678). and 261 pediatric patients aged from 1-19 years, were treated in 10 French pediatric hematology departments, members of the FRALLE study group, according to the FRALLE 2000 T guidelines (supplemental Figure 5 and supplemental Table 3):

Definitions: Rapid prednisone response (RPR) was defined as < 1000 circulating blasts/ μL on day 8, poor prednisone response (PPR) when ≥ 1000 circulating blasts/ μL on day 8. Morphologic assessment of a bone marrow aspirate was done at day 21. A chemosensitivity was represented by $\leq 5\%$ blasts, a chemoresistance by $> 5\%$. Complete remission (CR) was defined as: absence of physical signs of leukemia, bone marrow with active hematopoiesis and $< 5\%$ leukemic blast cells (identified morphologically), and normal cerebrospinal fluid. Patients were stratified into two groups.

Treatment stratification: Standard risk group (T1) was defined by the presence of all the following criteria: rapid prednisone response (RPR) at day 8, chemosensitivity (CHs) at day 21, MRD $< 10^{-2}$ at day 35. High risk group (T2) was defined by the presence of one of the following criteria: poor prednisone response (PPR) at day 8, chemoresistance at day 21 or MRD $\geq 10^{-2}$ at day 35. Patients treated according to T2 group were eligible for allogeneic stem cell transplantation (SCT) after late intensification $n^{\circ}1$ when a matched sibling or unrelated donor was available. Studies were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by local and multicenter research ethical committees.

Immunophenotypic and molecular characterization of T-ALL samples

Peripheral blood (PB) or bone marrow (BM) T-ALL samples were analyzed for immunophenotype, fusion transcripts (SIL-TAL1, CALM-AF10), oncogenic transcripts (HOXA9, TLX1 and TLX3), and T-cell receptor (TCR) recombination and NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN mutations, as previously described.¹⁻³

Minimal residual disease assessment

Immunoglobulin/T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangement based MRD evaluation was centrally assessed for patients who reached complete remission after the first induction cycle, on BM samples after induction (MRD1). MRD was centrally assessed by real-time quantitative allele-specific oligonucleotide PCR and interpreted according to EuroMRD group guidelines.⁴⁻⁶

Gene mutation screening

A custom capture Nextera XT gene panel (Illumina, San Diego, CA) targeting all coding exons and their adjacent splice junctions of 80 genes was designed, based on available evidence in hematological neoplasms (Supplemental Table 1). DNA Libraries were prepared using Nextera Rapid Capture Enrichment protocol and underwent 2x150bp paired-end sequencing on Illumina MiSeq sequencing system with MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). Briefly, sequence reads were filtered and mapped to the human genome (GRCh37/hg19) using in-house software (Polyweb, Institut Imagine, Paris). Annotated variants were selected after filtering out calls according to the following criteria: (i) coverage < 30x, <10 alternative reads or variant allelic fraction (VAF) <7%; (ii) Polymorphisms described in dbSNP, 1000Genomes, EVS, Gnomad and EXAC with a calculated mean population frequency >0.1%. Non-filtered variants were annotated using somatic database COSMIC (version 78) and ProteinPaint (St Jude Children's Research Hospital – Pediatric Cancer data portal).

Statistical analysis

Comparisons for categorical and continuous variables between *IDH1^{Mut}* or *IDH2^{Mut}* and *IDH^{WT}* subgroups were performed with Fisher's exact test and Mann-Whitney test respectively. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis to the last follow-up date censoring patients alive. The cumulative incidence of relapse (CIR) was calculated from the complete remission date to the date of relapse censoring patients alive without relapse at the last follow-up date. Relapse and death in complete remission were considered as competitive events. Univariate and multivariate analyses assessing the impact of categorical and continuous variables were performed with a Cox model. Proportional-hazards assumption was checked before conducting multivariate analyses. In univariate and multivariate analyses, age and log₁₀(WBC) were considered as continuous variables. All analyses were stratified on the trial. Variables with a p value less than 0.1 in univariate analysis were included in the multivariable models. Statistical analyses were performed with STATA software (STATA 12.0 Corporation, College Station, TX). All p-values were two-sided, with p<0.05 denoting statistical significance. Circos plots were generated using R software. Lollipop plots were generated with ProteinPaint (<https://pecan.stjude.org/#/proteinpaint>).

2- SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table 1. Custom capture Nextera XT gene panel

Custom capture Nextera XT gene panel					
AKT1	CTCF	HLA-B	MLL_KMT2A	PTPRD	STAT5B
ARID1A	CTNNB1	HNRNPA1B	MLL2_KMT2	RB1	SUZ12
ASB2	CXCR4	HRAS	NF1	RELN	TAL1
ASXL1	DDX3X	IDH1	NOTCH1	RHOA	TBL1XR1
ATM	DNM2	IDH2	NRAS	RPL10	TDRD6
BCL11B	DNMT3A	IKZF1	ODZ2	RPL5	TET1
CARD11	EED	IL7R	PHF6	RUNX1	TET2
CBL	EP300	IRF2BP2	PIAS1	SAMHD1	TP53
CBLB	ETV6	IRF4	PIK3CA	SETD2	TSR1
CCR4	EZH2	JAK1	PIK3R1	SF3B1	TYK2
CCR7	FAS	JAK3	PLCG1	SH2B3	UTX
CD58	FBXW7	JAKMIP2	POT1	SHP1	VAV1
CEBPA	FLT3	KIT	PRKCB	SKP2	WT1
CNOT3	FOXO3	KRAS	PTEN	SOCS1	ZEB1/TCF8
CREBPP	FYN	LCK	PTPN11	STAT1	ZFP36L2
CSNK1A1	GATA3	LEF1	PTPN2	STAT3	ZRSR2
CSNK2B	GPR183	MGA	PTPRC	STAT5A	
LMO1*	TAL1*	CD28	CISH	ZFHX4	
LMO2*	B2M	STIL	SOCS3		

Supplemental Table 2. *IDH1* and *IDH2* mutations identified in 1085 patients with T-ALL

Mutation	Genomique	Exon	Codon	No. of patients
<i>IDH1</i>				
p.R132C	2:209113113	4	CGT/TGT	3
p.R132S	2:209113113	4	CGT/AGT	2
p.I189V	2:209108284	6	ATT/GTT	2
p.W23*	2:209116208	3	TGG/TAG	1
p.D38N	2:209116164	3	GAT/AAT	1
p.I76V	2:209113281	4	ATC/GTC	1
p.K58R	2:209113334	4	AAG/AGG	1
p.R132G	2:209113113	4	CGT/GGT	1
p.R132H	2:209113112	4	CGT/CAT	1
p.F227V	2:209108170	6	TTT/GTT	1
p.F227V	2:209108170	6	TTT/GTT	1
p.N328S	2:209104595	8	AAT/AGT	1
p.G289S	2:209104713	8	GGC/AGC	1
p.A335S	2:209103946	9	GCC/TCC	1
Splice Region	2:209103789	6_ex9	InsA	1
p.R388C	2:209101886	10	CGT/TGT	1
<i>IDH2</i>				
p.R140Q	15:90631934	4	CGG/CAG	25
p.H173Y	15:90631836	4	CAC/TAC	1
p.D225E	15:90631594	5	GAC/GAA	1
p.D225N	15:90631596	5	GAC/AAC	1
p.F270S	15:90630677	6	TTT/TCT	1
p.Y238H	15:90630774	6	TAT/CAT	1
p.V305M	15:90630398	7	GTG/ATG	1
p.G361D	15:90628329	9	GGC/GAC	1

VAF : variant allele frequency

Supplemental Table 3. Chemotherapy in the FRALLE 2000 standard risk group T1 and high risk T2

FRALLE2000 GROUP T1		
Drug/Administration route	mg/m ² /day	Day
Prephase		
Prednisone/po-iv	60	1-7
MTX/it	By age*	1
Induction		
Prednisone/po-iv	40	8-28 then tapered
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	8, 15, 22, 29
Daunorubicin/iv	40	8, 9, 10, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	8, 10, 12, 15, 17, 19
Cyclophosphamide/iv	1000	8
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	8, 15
Consolidation		
Tioguanine/po	60	1-22
Cyclophosphamide/iv	1000	1-15
Aracytine/sc	30/12h	1-2, 8-9, 15-16
Prednisone/po-iv	40	29-35
Mercaptopurine/po	50	29-49
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	29, 43
Methotrexate/iv	5000	29, 42
Methotrexate/po	25	36
Leucovorin rescue	15/6h	36h after start HD-MTX
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	1, 15, 29, 43
Delayed intensification n°1		
Dexamethasone/po-iv	10	1-14 then tapered
Vindesine/iv	3 (max: 4 mg)	1, 8, 15
Adriamycine/iv	25	1, 8, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	3, 5, 8, 10, 12, 15
Tioguanine/po	60	29-49
Etoposide	150	29, 36, 43
Aracytine/sc	30/12h	29-30, 36-37, 43-44
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	3, (± 15 [§]), 30, (± 43 [§])
Interphase		
Prednisone/po-iv	40	1-7, 29-35
Mercaptopurine/po	50	17899
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1, 15, 29, 43
Methotrexate/iv	5000	1, 15, 29; 43
Methotrexate/po	25	8, 22, 36
Leucovorin rescue	15/6h	36h after start HD-MTX
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	1, 15, 29, 43 ^{§§}
Cranial irradiation	18 or 24 Gy [§]	40-45
Delayed intensification n°2		
Prednisone/po-iv	40	1-14 then tapered
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1, 8, 15
Daunorubicin/iv	40	1, 8, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	3, 5, 8, 10, 12, 15
Tioguanine/po	60	29-49
Cyclophosphamide/iv	1000	29
Aracytine/sc	30/12h	29-30, 36-37, 43-44
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age** ^{§§}	3, 30
Maintenance (18 months)		
Prednisone/po-iv	40	1-7 every 4 weeks ***
Mercaptopurine/po	50	daily
Methotrexate/po	25	weekly
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	Every 4 weeks ***
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age** ^{§§}	Every 3 months, 3 times

FRALLE2000 GROUP T2		
Drug/Administration route	mg/m ² /day	Day
Prephase		
Prednisone/po-iv	60	1-7
MTX/it	By age*	1
Induction		
Prednisone/po-iv	40	8-28 then tapered
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	8, 15, 22, 29
Daunorubicin/iv	40	8, 9, 10, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	8, 10, 12, 15, 17, 19
Cyclophosphamide/iv	1000	8
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	8, 15
Consolidation		
VEDA n°1		
Dexamethasone/po-iv	20	1-5
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1
Aracytine/iv	2000/12h	1, 2
Etoposide/iv	150	3, 4, 5
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	5
COPADM		
Prednisone/po-iv	40	1-5
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1
Adriamycine/iv	25	2
Methotrexate/iv	5000	1
Leucovorin rescue	15/6h	36h after start HD-MTX
Cyclophosphamide	500/12h	2, 3
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	2
VEDA n°2		
identical to n°1		
Delayed intensification n°1		
Dexamethasone/po-iv	10	1-14 then tapered
Vindesine/iv	3 (max: 4 mg)	1, 8, 15
Adriamycine/iv	25	1, 8, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	3, 5, 8, 10, 12, 15
Tioguanine/po	60	29-49
Etoposide	150	29, 36, 43
Aracytine/sc	30/12h	29-30, 36-37, 43-44
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	3, 30, (± 43 [§])
Interphase		
Prednisone/po-iv	40	1-7, 29-35
Mercaptopurine/po	50	17899
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1, 15, 29 (± 43 [§])
Methotrexate/iv	5000	1, 15, 29 (± 43 [§])
Methotrexate/po	25	8, 22, 36
Leucovorin rescue	15/6h	36h after start HD-MTX
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age**	1, 15, 29 (± 43 [§])
Cranial irradiation	18 to 24 Gy [§]	40-45
Delayed intensification n°2		
Prednisone/po-iv	40	1-14 then tapered
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	1, 8, 15
Daunorubicin/iv	40	1, 8, 15
L-Asparaginase/iv	6,000 IU/m ²	3, 5, 8, 10, 12, 15
Tioguanine/po	60	29-49
Cyclophosphamide/iv	1000	29
Aracytine/sc	30/12h	29-30, 36-37, 43-44
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age** ^{§§}	3, 30
Maintenance (18 months)		
Prednisone/po-iv	40	1-7 every 4 weeks ***
Mercaptopurine/po	50	daily
Methotrexate/po	25	weekly
Vincristine/iv	1.5 (max: 2 mg)	Every 4 weeks ***
MTX-ARAC-PRED/i.t	By age** ^{§§}	Every 3 months, 3 times

3- SUPPLEMENTAL FIGURES

Supplemental Figure 1. Lollipop plots indicating the observed mutations for *IDH1* and *IDH2* in the present series confront with Cosmic-reported mutations for AML and AITL

Supplemental Figure 2. Lollipop plots indicating the observed mutations for *IDH1* and *IDH2* affecting patients included in FRALLE and GRAALL protocol

Supplemental Figure 3. VAF of individual *IDH1* and *IDH2* mutations observed in 1085 T-ALL

Supplemental Figure 4. OS and CIR in the two subgroups (FRALLE and GRALL 03/05)

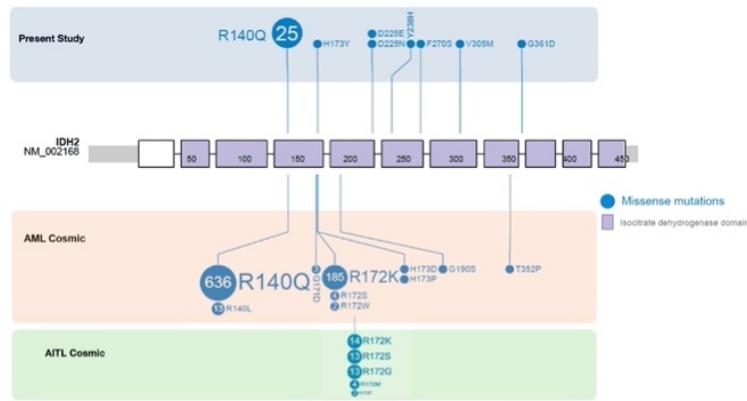
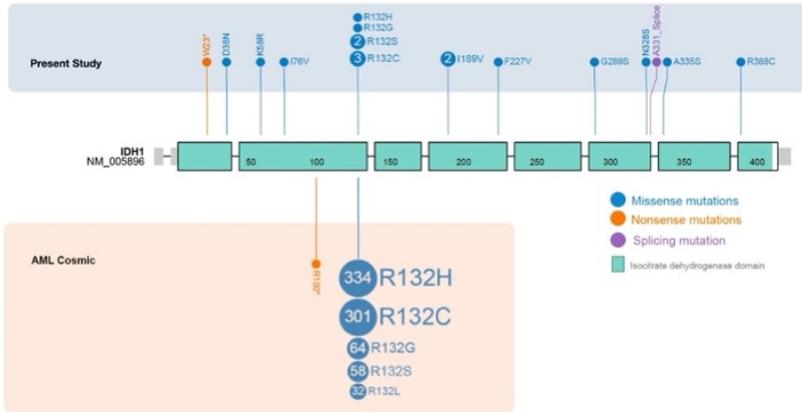
Supplemental Figure 5. General design of FRALLE 2000 T guidelines

4- SUPPLEMENTAL REFERENCES

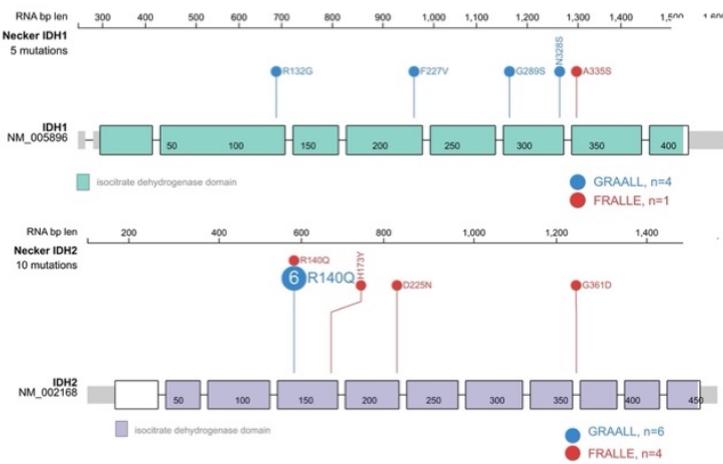
1. Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, et al. Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. *Blood*. 2003;101(7):2693–2703.
2. Bond J, Marchand T, Touzart A, et al. An early thymic precursor phenotype predicts outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *Haematologica*. 2016;101(6):732–740.
3. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(34):4333–4342.
4. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908–1975.
5. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*. 1998;12(12):2006–2014.
6. van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21(4):604–611.
7. Canisius S, Martens JWM, Wessels LFA. A novel independence test for somatic alterations in cancer shows that biology drives mutual exclusivity but chance explains co-occurrence. *bioRxiv*. 2016;52803.
8. Bond J, Marchand T, Touzart A, et al. An early thymic precursor phenotype predicts outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *Haematologica*. 2016;101(6):732–740.

Supplemental Figures *IDH1 IDH2 Mutations in T-ALL*

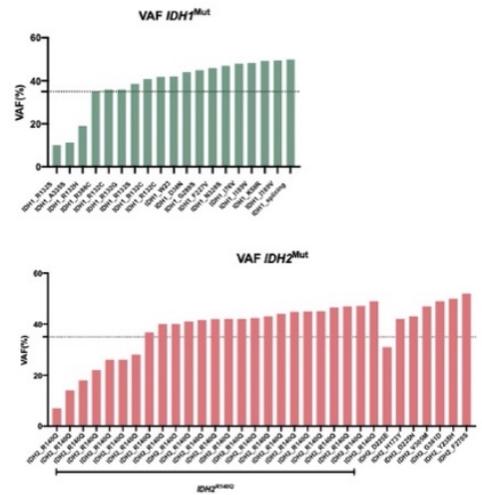
S.Fig.1



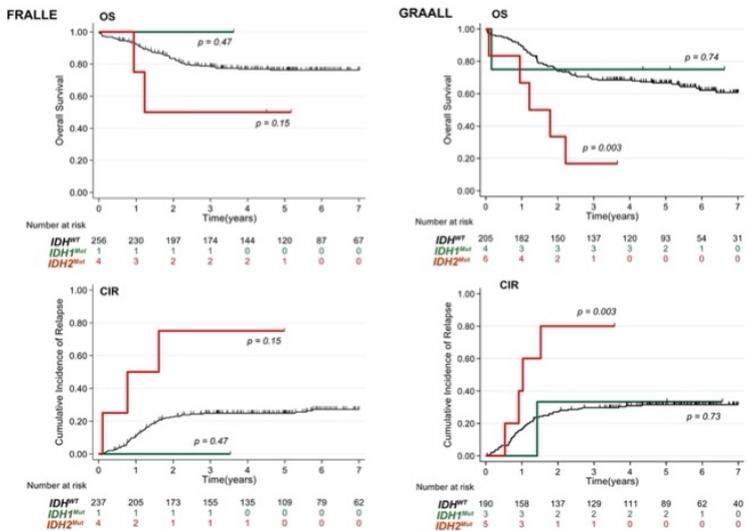
S.Fig.2



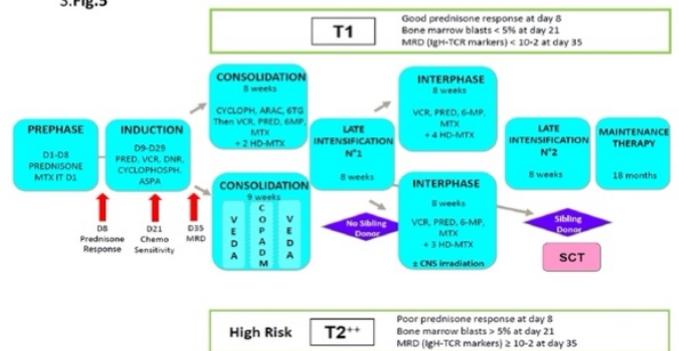
S.Fig.3



S.Fig.4



S.Fig.5



** Patients treated according T2 group were eligible for SCT after late intensification n°1 when a sibling donor was available

Article 3. Vers une nouvelle stratification moléculaire dans les LAL-T

Ce travail (en cours de finalisation) constitue l'aboutissement des précédents travaux de la 1^o partie de la thèse. Ainsi, après avoir identifié les nouvelles altérations associées à un impact pronostique dans les LAL-T nous avons réalisé une analyse intégrative de ces différentes altérations. Dans un premier temps nous avons exploré au sein de la cohorte adultes GRAALL0305, l'impact pronostique indépendant des 63 gènes de notre panel NGS. Après sélection des gènes significativement associés à un impact péjoratif sur la survie nous avons réalisé une analyse en multivariée en intégrant ces différentes variables. A l'issue de cette sélection nous avons identifié que les altérations de *NOTCH1/FBXW7*, *DNMT3A*, *IKZF1*, *TP53*, *N/K-RAS* et de la voie *PI3K/AKT* (*PIK3CA*, *PIK3R1* et *PTEN*) conservaient leur significativité en analyse multivariée. Nous proposons donc un classier NGS reposant sur le statut de ces altérations. Les patients de Low Risk (LR-NGS) correspondant maintenant aux patients *NOTCH1/FBXW7^{Mut}* sans altérations des gènes *DNMT3A*, *IKZF1*, *TP53*, *N/K-RAS* et de la voie *PI3K/AKT* (*PIK3CA*, *PIK3R1* et *PTEN*) et les patients *NOTCH1/FBXW7^{Mut}* ayant au moins une altération parmi les gènes *DNMT3A*, *IKZF1*, *TP53*, *N/K-RAS* et de la voie *PI3K* ou un profil *NOTCH1/FBXW7^{WT}* étaient classés en NGS-HR (High-Risk). Ce classier a été secondairement testé dans une cohorte de validation correspondant aux patients pédiatriques du protocole FRALLE2000T.

Afin d'identifier les patients à très haut risque (Very High Risk, VHR), nous avons montré que les patients NGS-HR qui présentaient une MRD positive en fin d'induction ($\geq 10^{-4}$) et un taux de GB au diagnostic $\geq 100 \times 10^9/L$ (34 patients sur 340, 10%) présentaient une survie globale significativement plus défavorable. A l'inverse, nous avons identifié un sous-groupe de patients (84/340, 25%) de très faible risque (Very Low Risk, VLR) correspondant aux patients NGS-LR avec une MRD négative et un taux de GB au diagnostic $< 10^{-4}$.

Cette analyse intégrative d'un très grand nombre d'altérations moléculaires identifiées dans les LAL-T représente la plus large cohorte de LAL-T rapportée à ce jour et pourrait constituer les bases d'une future stratification thérapeutique dans les protocoles à venir.

Article III

Titre :

NGS-based stratification refines the risk stratification in T-ALL and identifies a Very High-Risk subgroup of patients

Co-auteurs :

Mathieu Simonin, Etienne Lengliné, Ludovic Lhermitte, Aurélie Cabannes, Marie Balsat, Aline Schmidt, Marie-Émilie Dourthe, Aurore Touzart, Carlos Graux, Nathalie Gardel, Jean-Michel Cayuela, Isabelle Arnoux, Virginie Gandemer, Norbert Ifrah, Hervé Dombret, Elizabeth Macintyre, Arnaud Petit, Philippe Rousselot, André Baruchel, Nicolas Boissel, Vahid Asnafi

État de article :

En cours de préparation pour soumission.

Nom de la revue :

-

Année de Publication :

-

1 **NGS-based stratification refines the risk stratification in T-ALL and**
2 **identifies a Very High-Risk subgroup of patients**

3

4 Mathieu Simonin^{1,2}, Etienne Lengliné⁴, Ludovic Lhermitte¹, Aurélie Cabannes, Marie Balsat,
5 Aline Schmidt¹⁰, Marie-Émilie Dourthe³, Aurore Touzart, Carlos Graux⁵, Nathalie Grardel⁶,
6 Jean-Michel Cayuela⁷, Isabelle Arnoux⁸, Virginie Gandemer⁹, Norbert Ifrah¹⁰, Hervé Dombret⁴,
7 Elizabeth Macintyre¹, Arnaud Petit², Philippe Rousselot, André Baruchel³, Nicolas Boissel⁴,
8 Vahid Asnafi¹

9

10 **Affiliations:**

11 ¹Université de Paris (Descartes), Institut Necker-Enfants Malades (INEM), Institut national de
12 la santé et de la recherche médicale (Inserm) U1151, and Laboratory of Onco-Hematology,
13 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker Enfants-Malades, Paris, France

14 ²Department of Pediatric Hematology and Oncology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
15 (AP-HP), GH HUEP, Armand Trousseau Hospital, Paris, France and Sorbonne Universités,
16 UPMC Univ Paris 06, UMRS 938, CDR Saint-Antoine, GRC n°07, GRC MyPAC, Paris,
17 France

18 ³Department of Pediatric Hematology and Immunology, Robert Debré Hospital, AP-HP and
19 University Paris Diderot, Paris, France

20 ⁴Université Paris Diderot, Institut Universitaire d'Hématologie, EA-3518, Assistance Publique-
21 Hôpitaux de Paris, University Hospital Saint-Louis, Paris, France.

22 ⁵ Department of Hematology, Université catholique de Louvain, CHU UCL Namur - site
23 Godinne, Yvoir, Belgium

24 ⁶Laboratory of Hematology, CHRU Lille, Lille, France and U1172, INSERM, LILLE, France

25 ⁷Laboratory of Hematology, Saint-Louis Hospital, AP-HP, Paris, France

26 ⁸Hematology Laboratory, Marseilles University Hospital Timone, Marseilles, France

27 ⁹Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital of Rennes, Rennes,
28 France

29 ¹⁰PRES LUNAM, CHU Angers service des Maladies du Sang et INSERM U 892, Angers,
30 France,

31

32 **Short title:** NGS-based stratification in adult and pediatric T-ALL

33

34 **Corresponding author:**

35 Vahid Asnafi, Laboratory of Onco-Hematology, Tour Pasteur 2eme etage, Necker Enfants
36 Malades Hospital, 149 rue de Sevres, 75015 Paris, France.

37 E-mail: vahid.asnafi@aphp.fr ; Phone: +33 144.49.49.33

38

39 **Word counts:**

40 Abstract 279

41 Manuscript: 3036

42 **Figures/Tables count :** 4/1

43 **References count:** 19

44 **Supplementary Files:** Supplemental Tables: 9

45

46

47 **Keypoints**

48 1- NGS-based stratification refines risk classification in T-ALL

49 2- NGS classifier combined with MRD and WBC identifies a Very High-Risk group of patients

50

51 **Scientific category:** clinical

52

53 **Abstract**

54

55 **Purpose**

56 We previously reported a significantly better outcome in adult and pediatric T-cell acute
57 lymphoblastic leukemia (T-ALL) harboring *NOTCH1* and/or *FBXW7* (N/F) mutations without
58 alterations of *K-N-RAS* and *PTEN* (R/P). High-throughput next-generation sequencing
59 strategies (NGS) conduct us to refine the prediction of outcome in T-ALL

60 **Patients and Methods**

61 215 adult T-ALLs from the GRAALL 2003/2005 protocol were included in the study and 261
62 pediatric T-ALLs from the FRALLE2000 were used as validation cohort. Targeted whole-
63 exome sequencing of 63 T-ALL related oncogenes was performed.

64 **Results**

65 We confirm the prognostic classifier *NFRP* in the era of NGS and report new alterations
66 affecting *DNMT3A*, *IKZF1*, *TP53* and *PI3K* pathway (*PTEN*, *PIK3CA*, *PIK3RI*) as
67 independent prognostic factor in adult T-ALL. These observations led us to propose the first
68 NGS-based classifier in T-ALL defining low-risk patient (LR) as those with *N/F* mutations
69 without *RAS*, *PTEN*, *DNMT3A*, *TP53* and *IKZF1* alterations (238 of 476 patients, 50%). Among
70 the NGS-HR patients, we identified a subgroup of very high risk (VHR) patients (34/340, 10%)
71 after combining white blood cell count (WBC) $\geq 100 \times 10^9/L$ at diagnosis with Minimal
72 Residual Disease (MRD) at the end of induction $\geq 10^{-4}$ with OS at 5 years estimated at 31%,
73 95% CI (18%-53%) and EFS at 22%, 95% CI (12%-43%). Conversely, LR-NGS patients with
74 MRD $< 10^{-4}$ and WBC $< 100 \times 10^9/L$ (84/340, 25%) were defined at Very Low Risk (VLR)
75 with OS at 5 years estimated at 93%, 95% CI (88%-99%) and EFS at 90%, 95% CI (84%-97%).

76 **Conclusion**

77 T-ALL NGS-based stratification combined with WBC and MRD evaluation sharpen the
78 prognostic classification in T-ALL and identified a new subgroup of VHR patients who should
79 benefit from innovative therapeutic approaches.

80

81

82 INTRODUCTION

83 T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a class of aggressive hematological
84 cancers arising from the transformation of thymic cell precursors arrested at specific stages of
85 their differentiation and account for nearly 15-20% of ALL in children and adults.^{1, 2} The
86 outcome of pediatric and adult T-ALLs has globally improved by using more intensives poly-
87 chemotherapy, yet T-ALL remains of poor prognosis, notably for relapsing cases.³ About 25%
88 pediatric and 50% adult T-ALL patients ultimately relapse.^{4, 5} T-ALL relapses are associated
89 with dramatically poor prognosis despite salvage chemotherapy particularly due to secondary
90 chemotherapy resistance acquisition.^{6, 7} Therefore, it is urgent to improve risk stratification that
91 could allow those with the highest risk of relapse to be allocated to innovative treatment
92 strategies and/or hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT) in first remission. A critical
93 obstacle to this aim is the heterogeneous molecular nature of the disease, which is driven by a
94 densely interconnected network of oncogenic events, making their individualization toward an
95 optimal therapeutic stratification highly complex. The objective of this study was to identify
96 new molecular factors which could improve outcomes prediction in adult and pediatric T-ALL.

97 Although molecular genetic analyses and sequencing studies have led to the
98 identification of recurrent T-ALL alterations associated with prognostic impact, allowing more
99 precise prediction of the risk of relapse, a significant proportion of T-ALL relapses remain
100 unpredicted. In 2013 we provided the first T-ALL stratification based on *NOTCH1*, *FBXW7*,
101 *RAS* and *PTEN* status in adults T-ALL.⁵ Thus, patients harboring *NOTCH1* and/or *FBXW7*
102 mutations (*N/F^{Mut}*) without *N/K-RAS* mutation and/or *PTEN* (*R/P*) mutation and/or deletion
103 were associated with significant better outcomes than *N/F* wild type (*N/F^{WT}*) and/or *R/P* altered
104 (*R/P^{ALT}*) patients. More recently, these findings were also confirmed in the French pediatric
105 cohort of T-ALL patient from the FRALLE2000 cohort.⁴ In this study, *N/F/R/P* alteration
106 profile was a robust and a Minimal Residual Disease (MRD) independent predictor of relapse.

107 While the absence of *N/F* mutations appears to be strongly associated with poor
108 prognosis in T-ALL and T-cell lymphoblastic lymphoma^{5,8-10}, the identification of additive and
109 alteration with prognosis relevance in the oncogenetic background of *N/F* Mut T-ALL are still
110 unknown.^{9, 11-13} To date, validated and robust genetic prognostic factors in the various
111 international trials are still lacking in T-ALL. Several factors explain the lack of significant
112 success in identifying such prognostic factors; first, the size of the studies is often insufficient
113 to reveal the impact of certain rare alterations. Secondly, the great heterogeneity of the
114 methodology applied between studies and the variability of the genes explored but also the
115 patients (chemotherapy regimen) hamper cross-study comparability. This highlights the need
116 for a broad and comprehensive analysis of the prognostic impact associated with specific
117 genetic alterations in a homogeneous and large cohort of T-ALL patients.

118 Recently spreading of the next generation sequencing (NGS) approaches pave the way
119 to this aim. Based on a hybrid capture-based NGS (Agilent) of more than 60 genes, here we
120 propose an integrative approach to redefine the molecular risk-adapted classifier for T-ALLs.

121

122 **PATIENTS AND METHODS**

123 **Patients and Protocol**

124 The GRAALL-2003 protocol was a multicenter phase II trial that enrolled adults with T-ALL
125 between November 2003 and November 2005. The multicenter randomized GRAALL-2005
126 trial was the following phase III trial and was similar to the GRAALL-2003 trial, with the
127 addition of the randomized evaluation of an intensified sequence of hyperfractionated
128 cyclophosphamide during induction and late intensification. The present study concerns 215 of
129 these patients, for whom diagnostic DNA and/or cDNA was available. In the GRAALL0305
130 trials, allogeneic (allo) stem-cell transplantation (SCT) was offered in first CR in patients who
131 had a matched sibling or 10/10 fully matched unrelated donor and at least one of the following

132 criteria: CNS involvement at diagnosis; early resistance to corticosteroid after the first 1-week
133 prephase; early resistance to chemo- therapy after 1 additional week of treatment; and CR not
134 achieved after first induction. From 2000 to 2010, 405 T-ALL patients aged 1 to 14 years were
135 treated in 16 French pediatric FRALLE study group hematology departments according to the
136 FRALLE2000 T guidelines (as previously described).⁴ Informed consent was obtained from all
137 patients at trial entry. Both adult and pediatric trials were conducted in accordance with the
138 Declaration of Helsinki and approved by local and multicenter research ethical committees.

139 **Gene mutation screening**

140 A custom capture Nextera XT gene panel (Illumina, San Diego, CA) targeting all coding exons
141 and their adjacent splice junctions of 63 genes was designed, based on available evidence in
142 hematological neoplasms (**Supplemental Table 1**). DNA Libraries were prepared using
143 Nextera Rapid Capture Enrichment protocol and underwent 2x150bp paired-end sequencing on
144 Illumina MiSeq sequencing system with MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). Briefly, sequence
145 reads were filtered and mapped to the human genome (GRCh37/hg19) using in-house software
146 (Polyweb, Institut Imagine, Paris). Annotated variants were selected after filtering out calls
147 according to the following criteria: (i) coverage < 30x, <10 alternative reads or variant allelic
148 fraction (VAF) <7%; (ii) Polymorphisms described in dbSNP, 1000Genomes, EVS, Gnomad
149 and EXAC with a calculated mean population frequency >0.1%. Non-filtered variants were
150 annotated using somatic database COSMIC (version 78) and ProteinPaint (St Jude Children's
151 Research Hospital – Pediatric Cancer data portal).

152 **Copy number evaluation from next-generation sequencing (NGS) data**

153 We performed a computational approach previously described for the detection of copy number
154 variants (CNVs) from NGS data,¹⁴ including systematic analysis of the depth of *TP53* and
155 *IKZF1* genes coverage. This is based on variations in depth of coverage of aligned sequence

156 reads, using a locally developed algorithm. The CNVs detected were confirmed by high-
157 resolution CGH and/or MLPA analysis (kit P037-CLL-1 MRC-Holland).

158 **Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (array CGH)**

159 Diagnostic DNA was hybridized on Affymetrix (Santa Clara, CA) Cytogenetics whole Genome
160 2.7M Arrays (CGH-array), according to the manufacturer's recommendations. Data analysis
161 was performed with the Chromosome Analysis Suite (ChAS) software (Affymetrix®). Gene
162 copy number (GCN) aberrations were compared with the Database of Genomic variants (DGV)
163 <http://projects.tcag.ca/variation> to study only non-variant GCV aberrations.

164 **Immunophenotypic and molecular characterization of T-ALL samples**

165 Peripheral blood or bone marrow T-ALL samples were analyzed for immunophenotype, fusion
166 transcripts (SIL-TAL1, CALM-AF10), oncogenic transcripts (HOXA9, TLX1 and TLX3), and
167 T-cell receptor (TCR) recombination and *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* mutations, as
168 previously described.^{1,5,15}

169 **Minimal residual disease assessment**

170 Immunoglobulin/T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangement based Minimal Residual
171 Disease (MRD) evaluation was centrally assessed for patients who reached complete remission
172 after the first induction cycle, on BM samples after induction (MRD1). MRD was centrally
173 assessed by real-time quantitative allele-specific oligonucleotide PCR and interpreted
174 according to EuroMRD group guidelines.¹⁶⁻¹⁸

175 **Statistical analysis**

176 Patient characteristics and CR rates were compared using either the Fisher's exact test or the
177 Mann-Whitney U test. OS was calculated from the date of prephase initiation until the date of
178 death. CIR and DFS were calculated from the date of CR achievement until the date of relapse
179 or death free of relapse. OS and DFS were estimated using the Kaplan-Meier method and then
180 compared using the log-rank test.¹⁹ Multivariable regressions were performed using the Cox

181 model.²⁰ CIR was estimated taking into account death in first CR as a competing risk and then
182 compared using the Gray test. Multivariable models used the cause-specific hazard Cox model.
183 CSHRs and hazard ratios (HRs) were given with 95% CIs. All statistical tests were 2 sided,
184 with P <.05 denoting statistical significance. All analyses were performed on R 4.1.3
185 (<http://www.R-project.org>) statistical software. Tabulated summary statistics are frequency
186 (percentages) for discrete variables and medians (interquartile range) for continuous variables,
187 unless otherwise specified

188

189 **RESULTS**

190 **Next generation sequencing (NGS) approach confirm and refines previous Sanger-based** 191 ***NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* classifier in adult T-ALL**

192 The NGS analysis were applied to 215 GRAALL-Treated patients. From them 170 have been
193 included in Trinquand et al study⁵ and were also been sequenced by Sanger analysis.

194 NGS approach was associated with higher sensitivity than Sanger leading to the identification
195 of *NOTCH1* and *FBXW7* mutations previously undetected (17 and 8 mutations respectively)
196 (Figure 1A). Furthermore, NGS approach allowed pan exon sequencing of *N/K RAS* and *PTEN*
197 while Sanger was restricted to the mutational hot spot, hence NGS revealed 6 *N/K RAS* and 2
198 *PTEN* mutations previously undetected. Collectively, the *NFRP* classifier was conserved in
199 154/170 (91%) of the cases. Conversely, in 16/170 (9%) of cases, NGS led to a classification
200 modification; 6 patients previously classified as LR became HR based on NGS analysis
201 (*RAS/PTEN* abnormalities) and 10 patients previously classified as HR became LR (*N/F*
202 mutations) (**Figure 1A**). Overall survival (OS), Disease free Survival (DFS) and HR were
203 comparable between Sanger LR-NFRP and NGS LR-NFRP and between Sanger and NGS HR-
204 NFRP (**Figure 1B and 1C**). Taken together, these data confirms that NGS approach both
205 validates and refined the *NFRP* classification previously based on Sanger analysis

206

207 **Univariate prognostic impact of genes alterations in adults T-ALL**

208 Based on the NGS analysis of 63 genes issued from our panel (**Supplemental Table 1**). We
209 explored the incidence and the prognostic significance associated with these alterations among
210 215 T-ALL adults patients from the adult GRAALL03_05 trials (**Supplemental Data**).

211 *NOTCH1* mutations were the most frequent alterations observed in our cohort, affecting 74%
212 of adults, followed by *CDKN2A* alterations; 65%, *PHF6* alterations (48%), *BCL11B* mutations;
213 21% and *FBXW7* mutations; 20% (**Figure 2A and Supplemental Table 2**).

214 In univariate analysis, *NOTCH1/FBXW7* mutations (167/215 patients, 78%), *BCL11B*
215 mutations and *PHF6* alterations were associated with a lower hazard ratio (HR) for death; HR=
216 0.43, 95%CI (0.27-0.68); $p < .001$, HR= 0.5, 95%CI (0.27-0.95) $p = .03$ and HR= 0.51, 95%CI
217 (0.32-0.81) $p = .005$ respectively, whereas alterations affecting *N-K-RAS* (28/215 patients, 13%)
218 , *IKZF1*, (15/215 patients, 7%), *DNMT3A* (20/215, 9%), *IDH1/2* (10/215 patients, 4%), *TP53*
219 (11/215 patients, 5%) and *PI3K*-pathway (*PTEN^{Alt}*, *PIK3CA* and *PIK3R1* mutations; 37/215
220 patients, 17%) conferred a higher risk of death (all $p < .05$, **Figure 2B and Supplemental Table**
221 **3**).

222

223 **Multivariate prognostic impact of genes alterations in adults T-ALL**

224 In a multivariate Cox model after variable selection among the significant variable in univariate
225 analysis ($p < .05$), the presence of *N/F* predict prolonged OS (HR, 0.49, 95%CI 0.29-0.82; $p =$
226 .007), of note *BCL11B* mutations and *PHF6* alterations were not significantly associated with
227 prolonged OS after adjusting with other significant variables. Conversely, apart *IDH1/2*,
228 mutations associated with poor outcome retain unfavourable hazard ratio >1.5 . Thus,
229 combining *IKZF1*, *DNMT3A*, *TP53*, *IDH1/2*, *N-K RAS*, *PI3K* pathway alterations, *N/F*,

230 *BCL11B* and *PHF6*, only *N/F*, *DNMT3A*, *TP53*, *N-K-RAS*, *IKZF* and *PI3K* pathway alterations
231 remained statistically associated with dismal outcomes (**Figure 2C**)

232

233 ***N/F*, *N-K-RAS*, *PI3K* pathway, *IKZF1* alterations, *TP53* alterations and *DNMT3A***
234 **Mutational Status Identifies a new oncogenetic classifier in adult T-ALL**

235 These observations led us to propose a T-ALL NGS-based oncogenetic classifier defining NGS-
236 Low Risk (NGS-LR) patients as those with *N/F* mutation but no *N-K-RAS* mutation, *PI3K*
237 pathway alterations, *IKZF1* alterations, *TP53* alterations and *DNMT3A* mutations (here, 107 of
238 215 patients; 50%) and all other patients as NGS-High Risk (NGS-HR) patients (108/215,
239 50%). Importantly, 23 patients of 130 (18%) who would have previously classified in LR based
240 on their *NFRP* status joined the NGS-HR subgroup based on their *PI3K* (other than *PTEN*
241 alterations), *DNMT3A*, *TP53* or *IKZF1* status (**Figure 2D**). Comparing the oncogenetic risk
242 classification based only on the *NFRP* mutational status to this refined NGS-based oncogenetic
243 classifier, HRs for high-risk patients increased from 2.80 (95% CI, 1.79-4.39) to 3.88 (95% CI,
244 2.33-6.45) for OS and from 2.78 (95% CI, 1.85-4.18) to 3.59 (95% CI, 2.29 –5.62) for EFS
245 (**Supplemental Table 4**).

246

247 **Validation of this NGS-based classifier in a cohort of 261 pediatric T-ALL**

248 We then performed external validation of the NGS-based classifier in a distinct cohort of 261
249 T-ALL pediatric patients treated according the FRALLE2000T protocol (**Supplemental Data**).
250 As previously described for adult patients, the proportion of pediatric patients was equally
251 distributed between the two NGS risk groups, patients assigned to the NGS-HR group were
252 130/261, 50% and 131/261, 50% in the NGS-LR group.

253 Of note, 18 patients of 149 (12%) who would have previously classified in LR based on their
254 *NFRP* status joined the HR-NGS subgroup based on their *PI3K* pathway, *DNMT3A*, *TP53* or

255 *IKZF1* status (**Figure 3A**). Comparing the oncogenetic risk classification based only on the
256 *NFRP* mutational status to this refined NGS-based oncogenetic classifier, HRs for high-risk
257 patients increased from 2.26 (95% CI, 1.35-3.78) to 2.88 (95% CI, 1.65-5.03) for OS and from
258 2.40 (95% CI, 1.57-3.69) to 2.71 (95% CI, 1.73-4.25) for EFS (**Supplemental Table 5**) in the
259 pediatric T-ALL patients.

260 Taken together these data demonstrate that the detection of *DNMT3A*, *TP53*, *IKZF1* and *PI3K*
261 pathway alterations add significant prognostic value to assessment of *NFRP* status and allow
262 identification of a significant proportion (238/476, 50%) of poor prognosis adult and pediatric
263 T-ALL patient whom 41/238 (17%) were not identified with the previous *NFRP* classifier while
264 their outcomes were similar to HR patients (**Figure 3B**). Overall, after combining the 2 cohorts
265 of adults and pediatric T-ALL, our NGS-based classifier clearly improves the stratification
266 between HR and LR patients; HRs for high-risk patients increased from 2.55 (95% CI, 1.82-
267 3.59) to 3.40 (95% CI, 2.34-4.95) for OS and from 2.60 (95% CI, 1.93-3.49) to 3.13 (95% CI,
268 2.28-4.31) for EFS (**Figure 3C and Supplemental Table 6**). Clinical characteristics and
269 mutational landscape comparing NGS-HR and NGS-LR patients were depicted in **Table 1 and**
270 **Figure 3D and 3E.**

271 Considering that this NGS-based classifier mostly improved the LR group stratification, we
272 next aimed to identify a very high-risk (VHR) group of patients among the subgroup of HR-
273 NGS patients. To this aim, we combined the clinico-biological characteristics previously
274 described as associated with a prognostic impact in adult and pediatric T-ALL to this NGS-
275 based classifier.

276

277 **NGS-based stratification combined with MRD and WBC at diagnosis identifies a Very**
278 **High-Risk subgroup of patients in adult and pediatric T-ALL**

279 Importantly, by multivariate analyses, in addition to NGS-classifier, two factors that were
280 identified to predict relapse: $\text{WBC} \geq 100 \times 10^9/\text{L}$ and MRD positivity (10^{-4} cutoff) (**Figure 4A**
281 **and Supplemental Table 7**).

282 To determine whether these two parameters could provide additional information regarding
283 relapse risk and overall survival, the NGS-based classifier was combined with MRD at EOI
284 status and WBC at diagnosis. A subset of 340 of 476 (71%) patients (178 new NGS-LR and
285 162 NGS-HR patients) were evaluated for genomic IgH/TCR MRD level at time of CR
286 achievement after the first induction course.

287 Based on these parameters, 3 subsets of patients were defined. The 34 patients (10%) with all
288 the 3 adverse parameters associated ($\text{WBC} \geq 100 \times 10^9/\text{L}$ and $\text{MRD1} \geq 10^{-4}$ and HR-NGS) were
289 defined as at very high risk (VHR) of relapse with a 5-year estimated EFS of 22%, 95% CI
290 (12%-43%) and a 5-year estimated OS of 31%, 95% CI (18%-53%), conversely, the 84 patients
291 (25%) with $\text{WBC} < 100 \times 10^9/\text{L}$ and $\text{MRD1} < 10^{-4}$ and LR according the NGS-based classifier
292 were classified at very low risk (VLR) with a 5-year estimated EFS of 90%, 95% CI (84%-
293 97%) and a 5-year estimated OS of 93%, 95% CI (88%-99%). The 222 remaining patients
294 (65%) were considered as associate with an intermediate risk (IR) with a 5-year estimated EFS
295 of 68%, 95% CI (62%-75%) and a 5-year estimated OS of 78%, 95% CI (73%-84%), $p < .001$
296 (**Figures 4B, C, D, E, and Supplemental Table 8**).

297 Taken together, the NGS-classifier improves prediction of the risk of relapse and outcome for
298 patients with a WBC count $\geq 100 \times 10^9/\text{L}$ at diagnosis and $\text{MRD} \geq 10^{-4}$ at EOI. Interestingly, the
299 oncogenetic classifier efficiently identified for the first time a subset of patients at VHR of
300 relapse when associating NGS-HR, $\text{MRD} \geq 10^{-4}$, and WBC count $\geq 100 \times 10^9/\text{L}$ (**Supplemental**
301 **Table 9**).

302

303 **DISCUSSION**

304 The objective of this study was to identify new molecular factors which could improve
305 outcomes prediction in adult and pediatric T-ALL. Here we provide, on a large serie of
306 homogeneous treated adult and pediatric T-ALL, a comprehensive outcome analysis of clinical
307 and oncogenetics factors. Combining new alterations associated with poor outcomes such as
308 *PI3K* pathway alterations (including *PTEN* alterations but also *PIK3CA* and *PIK3RI* activating
309 mutations), *DNMT3A* mutations, *IKZF1* alterations (deletions and mutations) and *TP53*
310 alterations (deletions and mutations), we refined our previous *NFRP* classifier leading to
311 relocate a significant number of patients (17%) previously considered at LR while presenting
312 poor outcome. Importantly, NGS alterations associated with clinico-biological parameters such
313 as MRD at EOI (10^{-4} cutoff) and WBC at diagnosis ($100 \times 10^9/L$ cutoff) led us to identify a
314 subgroup of very high risk (VHR) group of patients (nearly 10%) associated with extremely
315 poor prognosis (EFS at 22% at 5 year). One can suggest that VHR T-ALL patients should be
316 screened and identified from the moment of diagnosis to benefit from therapeutic intensification
317 and/or innovative targeted therapies in front line. The pivotal objective associated with risk-
318 stratification should be to minimize the potential toxicity from overtreatment in the patients
319 who are at low risk of relapse while appropriately treating patients who are at higher risk of
320 poor outcomes. The excellent prognosis associated with VLR subgroup of patient raise the
321 question of therapeutic de-escalation given the risk at short and long term associated with
322 intensified chemotherapy.

323 Beyond the interest that could represent the contribution of a new risk stratification in T-ALL
324 at front-line therapeutic stratification, identification of the main alterations present in NGS-
325 based classifier could also contribute to propose new actionable therapeutic targets, in particular
326 for VHR subgroup of patients which exhibits high rates of intrinsically treatment-resistant
327 disease. APR-246, a small compound that restores wild-type configuration to mutated p53, has

328 already shown promising results for p53-mutant patients affected by other hematologic
329 malignancies and could be a suitable option for patients with T-ALL *TP53^{Alt}*.²¹ *N-K RAS*
330 mutations leading to MAPK-ERK signaling activation could also represent a specific target for
331 MEK inhibitors (Trametinib, Selumetinib). MEK inhibitors synergize with glucocorticoids in
332 primary T-ALL patient and combination of MEK inhibitors with chemotherapy has been shown
333 to be feasible.²² Data reported for patients with AML suggest that *DNMT3A* mutation
334 confers increased sensitivity to hypomethylating agents,²³ providing a rationale for evaluation
335 of these drugs in *DNMT3A*-mutated T-ALL. At least, preclinical *in vitro* studies using T-ALL
336 cell lines, demonstrate synergy between PI3K inhibitors and several chemotherapeutic agents
337 (glucocorticoid, doxorubicin and nelarabine).²⁴

338 In conclusion, our study identifies the first NGS-based classifier in T-ALL including several
339 oncogenes actionable by targeted therapy. Furthermore, we revealed a subgroup of patients
340 associated with extremely poor prognosis who should benefit from innovative and/or intensified
341 therapy.

342

343

342 **REFERENCES**

- 343 1. Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, et al: Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-
344 acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage
345 commitment. *Blood* 101:2693–2703, 2003
- 346 2. Van Vlierberghe P, Ferrando A: The molecular basis of T cell acute lymphoblastic
347 leukemia. *J Clin Invest* 122:3398–3406, 2012
- 348 3. Desjonquères A, Chevallier P, Thomas X, et al: Acute lymphoblastic leukemia relapsing
349 after first-line pediatric-inspired therapy: a retrospective GRAALL study. *Blood Cancer J*
350 6:e504, 2016
- 351 4. Petit A, Trinquand A, Chevret S, et al: Oncogenetic mutations combined with MRD
352 improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*
353 131:289–300, 2018
- 354 5. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, et al: Toward a
355 NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute
356 lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia
357 study. *J Clin Oncol* 31:4333–4342, 2013
- 358 6. Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, et al: In adults with standard-risk acute
359 lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic
360 transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective
361 than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the
362 International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). *Blood* 111:1827–1833, 2008
- 363 7. Bhojwani D, Pui C-H: Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*
364 14:e205-217, 2013
- 365 8. Trinquand A, Plesa A, Abdo C, et al: Toward Pediatric T Lymphoblastic Lymphoma
366 Stratification Based on Minimal Disseminated Disease and NOTCH1/FBXW7 Status.
367 *Hemasphere* 5:e641, 2021
- 368 9. Taj MM, Moorman AV, Hamadeh L, et al: Prognostic value of Oncogenetic mutations in
369 pediatric T Acute Lymphoblastic Leukemia: a comparison of UKALL2003 and
370 FRALLE2000T protocols. *Leukemia* 36:263–266, 2022
- 371 10. Liu R-B, Guo J-G, Liu T-Z, et al: Meta-analysis of the clinical characteristics and
372 prognostic relevance of NOTCH1 and FBXW7 mutation in T-cell acute lymphoblastic
373 leukemia. *Oncotarget* 8:66360–66370, 2017
- 374 11. Clappier E, Collette S, Grardel N, et al: NOTCH1 and FBXW7 mutations have a
375 favorable impact on early response to treatment, but not on outcome, in children with T-cell
376 acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) treated on EORTC trials 58881 and 58951. *Leukemia*
377 24:2023–2031, 2010
- 378 12. Kox C, Zimmermann M, Stanulla M, et al: The favorable effect of activating NOTCH1
379 receptor mutations on long-term outcome in T-ALL patients treated on the ALL-BFM 2000
380 protocol can be separated from FBXW7 loss of function. *Leukemia* 24:2005–2013, 2010
- 381 13. Zuurbier L, Homminga I, Calvert V, et al: NOTCH1 and/or FBXW7 mutations predict for
382 initial good prednisone response but not for improved outcome in pediatric T-cell acute
383 lymphoblastic leukemia patients treated on DCOG or COALL protocols. *Leukemia* 24:2014–
384 2022, 2010
- 385 14. Yoon S, Xuan Z, Makarov V, et al: Sensitive and accurate detection of copy number
386 variants using read depth of coverage. *Genome Res* 19:1586–1592, 2009
- 387 15. Bond J, Marchand T, Touzart A, et al: An early thymic precursor phenotype predicts
388 outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a
389 Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *Haematologica* 101:732–
390 740, 2016

- 391 **16.** van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al: EuroFlow antibody panels for
392 standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and
393 malignant leukocytes. *Leukemia* 26:1908–1975, 2012
- 394 **17.** Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, et al: Real-time quantitative PCR for the
395 detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region
396 specific TaqMan probes. *Leukemia* 12:2006–2014, 1998
- 397 **18.** van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, et al: Analysis of minimal residual
398 disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative
399 PCR data. *Leukemia* 21:604–611, 2007
- 400 **19.** Kaplan EL, Meier P: Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of*
401 *the American Statistical Association* 53:457–481, 1958
- 402 **20.** Cox DR: Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society*
403 *Series B (Methodological)* 34:187–220, 1972
- 404 **21.** Cluzeau T, Sebert M, Rahmé R, et al: Eprenetapopt Plus Azacitidine in TP53-Mutated
405 Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia: A Phase II Study by the Groupe
406 Francophone des Myélodysplasies (GFM). *J Clin Oncol* JCO2002342, 2021
- 407 **22.** Melosky B, Bradbury P, Tu D, et al: Selumetinib in patients receiving standard
408 pemetrexed and platinum-based chemotherapy for advanced or metastatic KRAS wildtype or
409 unknown non-squamous non-small cell lung cancer: A randomized, multicenter, phase II
410 study. *Canadian Cancer Trials Group (CCTG) IND.219. Lung Cancer* 133:48–55, 2019
- 411 **23.** Metzeler KH, Walker A, Geyer S, et al: DNMT3A mutations and response to the
412 hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 26:1106–1107, 2012
- 413 **24.** Lonetti A, Antunes IL, Chiarini F, et al: Activity of the pan-class I phosphoinositide 3-
414 kinase inhibitor NVP-BKM120 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 28:1196–
415 1206, 2014
- 416
- 417

418 **ACKNOWLEDGEMENTS**

419 The authors would like to thank all participants in the GRAALL-2003 and GRAALL-2005
420 study groups, the SFCE and the investigators of the 16 SFCE centers involved in collection and
421 provision of data and patient samples, and V. Lheritier for collection of clinical data

422 This work was supported by grants to Necker laboratory from the CAncer Research for
423 PErsonalized Medicine (CARPEM), Association pour la Recherche contre le Cancer (Equipe
424 labellisée), Institut National du Cancer PRT-K 18-071 and Fédération Leucémie Espoir. The
425 GRAALL was supported by grants P0200701 and P030425/AOM03081 from the Programme
426 Hospitalier de Recherche Clinique, Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, France and the
427 Swiss Federal Government in Switzerland. Samples were collected and processed by the AP-
428 HP "Direction de Recherche Clinique" Tumor Bank at Necker-Enfants Malades. M. Simonin
429 was supported by « Action Leucémie », « Soutien pour la formation à la recherche
430 translationnelle en cancérologie - Plan cancer 2009-2013 » and « La Ligue contre le Cancer ».

431

432

433 **FIGURES LEGENDS**

434 **Figure 1. NGS-based approach confirms and refines the historical classifier in adult T-**
435 **ALL**

436 (A) Sankey diagram depicting the mutations identified with NGS and/or Sanger and the
437 associated classifier modification according the *NOTCH1*, *FBXW7*, *N-K RAS* and *PTEN* status.

438 (B) Comparison of overall survival (OS) according to NGS or Sanger-based method to identify
439 NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN (*NFRP*) classifier in adult T-ALL. At 5 years, OS was
440 estimated at **75%**, 95% CI (66%-84%) in Sanger-LR-*NFRP* compared with **77%**, 95% CI
441 (70%-85%) in NGS-LR-*NFRP*, and **50%**, 95% CI (40%-62%) in Sanger-HR-*NFRP* compared
442 with **48%**, 95% CI (38%- 60%) in NGS-HR-*NFRP*. The hazard ratio (HR) for shorter OS in
443 the in Sanger-HR-*NFRP* was **2.28; 95% CI (1.39 – 3.75)**, $p < .001$, and **2.90, 95%CI (1.76 –**
444 **4.8)**, $p < .001$, in NGS-HR-*NFRP*.

445 (C) Comparison of disease-free survival (DFS) according to NGS or Sanger-based method to
446 identify NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN (*NFRP*) classifier in adult T-ALL. At 5 years, DFS was
447 estimated at **72%**, 95% CI (63%-83%) in Sanger-LR-*NFRP* compared with **74%**, 95% CI
448 (66%-83%) in NGS-LR-*NFRP*, and **38%**, 95% CI (27%-54%) in Sanger-HR-*NFRP* compared
449 with **34%**, 95% CI (23%- 50%) in NGS-HR-*NFRP*. The hazard ratio (HR) for shorter DFS in
450 the in Sanger-HR-*NFRP* was **2.59; 95% CI (1.55 – 4.33)**, $p < .001$, and **3.44, 95%CI (2.03 –**
451 **5.81)**, $p < .001$, in NGS-HR-*NFRP*.

452

453 **Figure 2. Identification of new prognostic molecular factor in adult T-ALL**

454 (A) Bar plot showing the alterations frequency in adult T-ALL revealed by NGS-based
455 approach

456 (B) HRs of death according to genes alterations in adult T-ALL

457 (C) Forest plot showing multivariate Cox regression analysis of the effect of different genes
458 alterations on OS identified in univariate analysis. *DNMT3A* mutations (HR, 2.61, 95%CI 1.25-
459 5.45; $p = .011$), *TP53* alterations (HR, 3.14, 95%CI 1.38-7.13; $p = .006$), *PI3K* pathway
460 alterations (HR, 2.09, 95%CI 1.19-3.68; $p = .001$) and *N-K-RAS* mutations (HR, 2.2, 95%CI
461 1.15-4.2; $p = .0017$), *IKZF1* (HR, 1.6, 95%CI 0.74-3.46; $p = .23$)
462 (D) OS, CIR, EFS and DFS in 215 adult T-ALL (GRAALL0305 protocols) by *NFRP* and NGS-
463 based classifier status, 23 patients of 130 (18%) who would have previously classified in LR
464 based on their *NFRP* status joined the NGS-HR subgroup based on their *PI3K* (other than *PTEN*
465 alterations), *DNMT3A*, *TP53* or *IKZF1* status.

466

467 **Figure 3. Identification of a NGS-based classifier in adult and pediatric T-ALL**

468 (A) Overall Survival (OS) and Cumulative incidence of relapse (CIR) in 261 pediatric T-ALL
469 (FRALLE2000T protocol) by *NFRP* classifier and NGS-based classifier status, 18 patients of
470 149 (12%) who would have previously classified in LR based on their *NFRP* status joined the
471 HR-NGS subgroup.

472 (B) Overall Survival (OS) and Cumulative incidence of relapse (CIR) in the 476 T-ALL patients
473 by *NFRP* classifier and NGS-based classifier status. Overall, 41/238 (17%) patients were not
474 identified with the previous *NFRP* classifier while their outcomes were similar to HR patients

475 (C) Overall survival (OS) and Cumulative incidence of relapse (CIR) in 476 T-ALL patients by
476 NGS-based classifier. At 5 years, OS was estimated at 84%, 95% CI (80%-89%) in LR-NGS
477 compared with 58%, 95% CI (51%-65%) in HR-NGS patients ($p < .001$). The hazard ratio (HR)
478 for shorter OS was 3.40, 95% CI (2.34-4.95), $p < .001$, for the latter group. At 5 years, CIR was
479 estimated at 19% 95%CI (13%-24%) in LR-NGS compared with 40%, 95%CI (33%-47%) in
480 HR-NGS patients ($p < .001$), In the latter group, the specific hazard of relapse (SHR) was 2.52,
481 95% CI (1.75-3.64), $p < .001$.

482 (D) Oncoplot depicting the genetic anomalies observed in HR-NGS or LR-NGSS patients of
483 the GRAALL03/05 and FRALLE2000 studies. Genes are classified by functional groups

484 (E) Upset Plot describing intergenic mutational patterns by patient occurrence in HR-NGS
485 group

486 **Figure 4. NGS-based classifier combined with WBC and MRD identifies a Very High-**
487 **Risk group of T-ALL patients.**

488 (A) Forest plot showing multivariate Cox regression analysis of the effect of NGS-based
489 classifier combined with WBC at diagnosis (cut of $100 \times 10^9/L$) and MRD at end of induction
490 (cut of 10^{-4}) on OS.

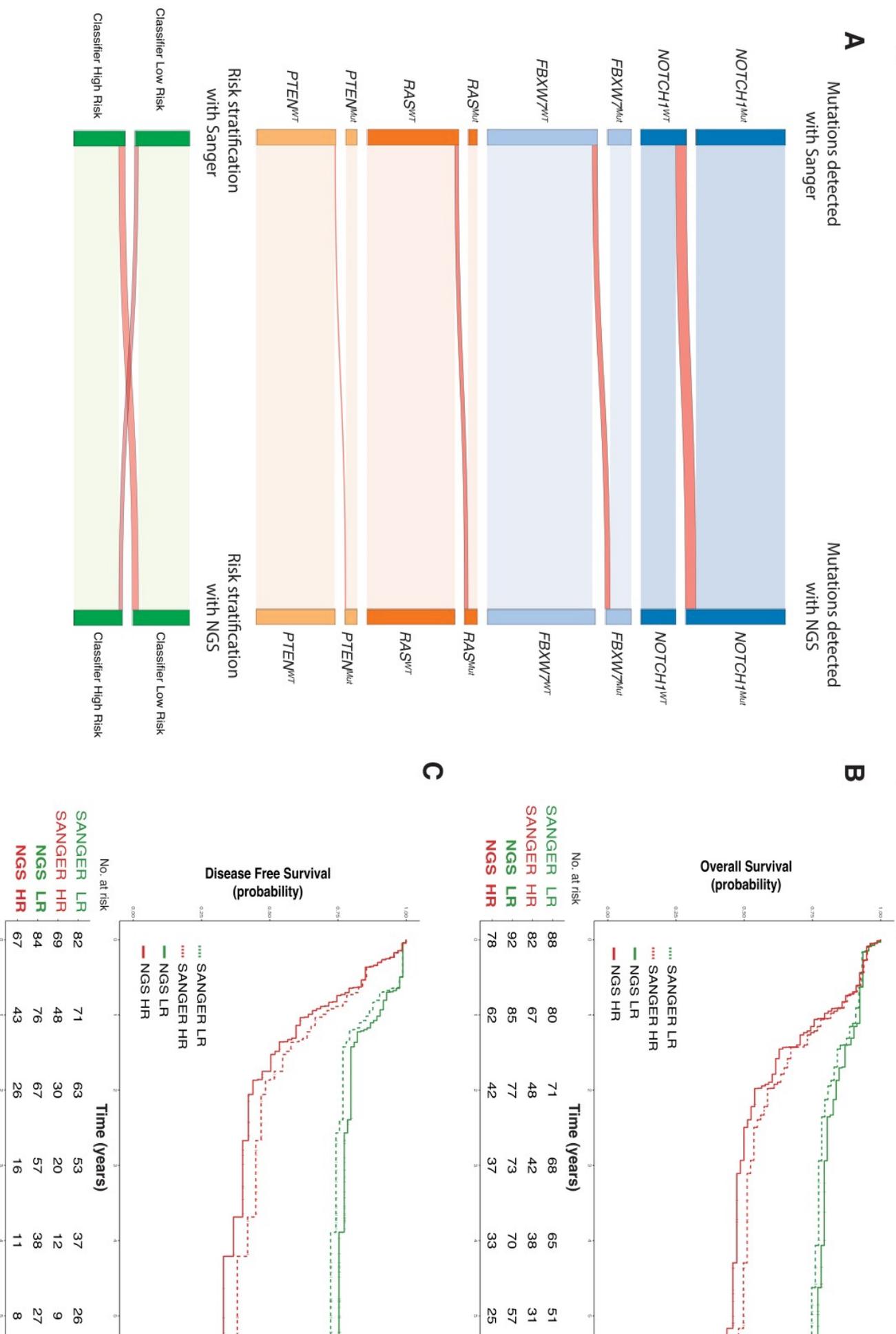
491 (B) OS in 340 T-ALL patients by NGS-based classifier combined with WBC and MRD. At 5
492 years, OS was estimated at 31%, 95% CI (18%-53%) for VHR patients, 78%, 95% CI (73%-
493 84%) for IR patients and 93%, 95% CI (88%-99%) for VLR patients.

494 (C) At 5 years, CIR was estimated at 66%, 95% CI (44%-80%) for VHR patients, 28%, 95%
495 CI (22%-34%) for IR patients and 10%, 95% CI (3%-16%) for VLR patients

496 (D) At 5 years, EFS was estimated at 22%, 95% CI (12%-43%) for VHR patients, 68%, 95%
497 CI (62%-75%) for IR patients and 90%, 95% CI (84%-97%) for VLR patients

498 (E) At 5 years, DFS was estimated at 25%, 95% CI (14%-47%) for VHR patients, 71%, 95%
499 CI (65%-77%) for IR patients and 90%, 95% CI (83%-97%) for VLR patients

Figure 1. SANGER vs NGS for NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN classifier (GRAALL0305)



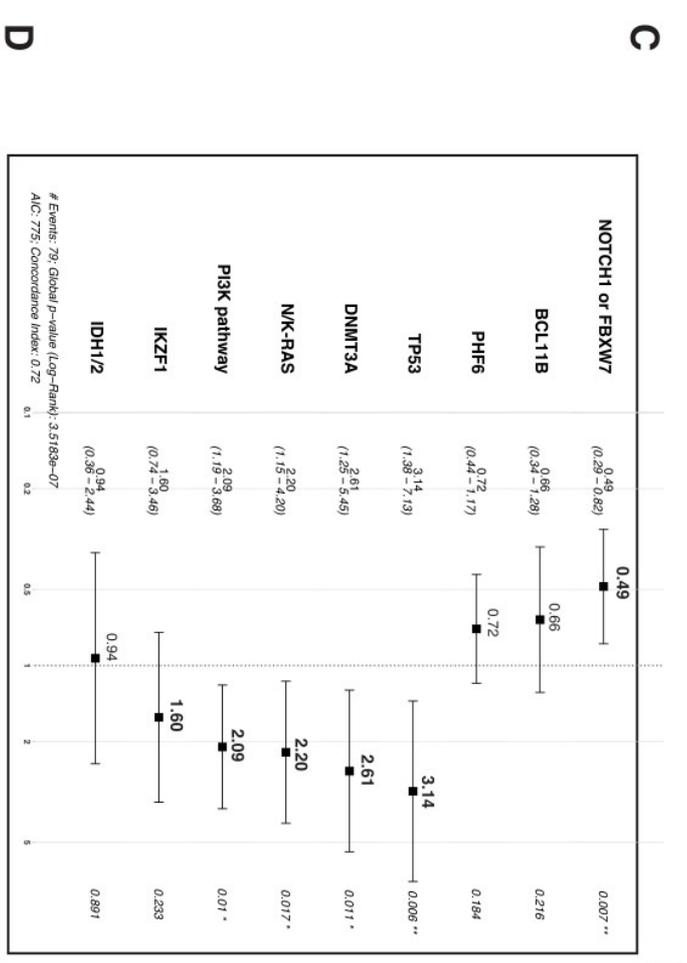
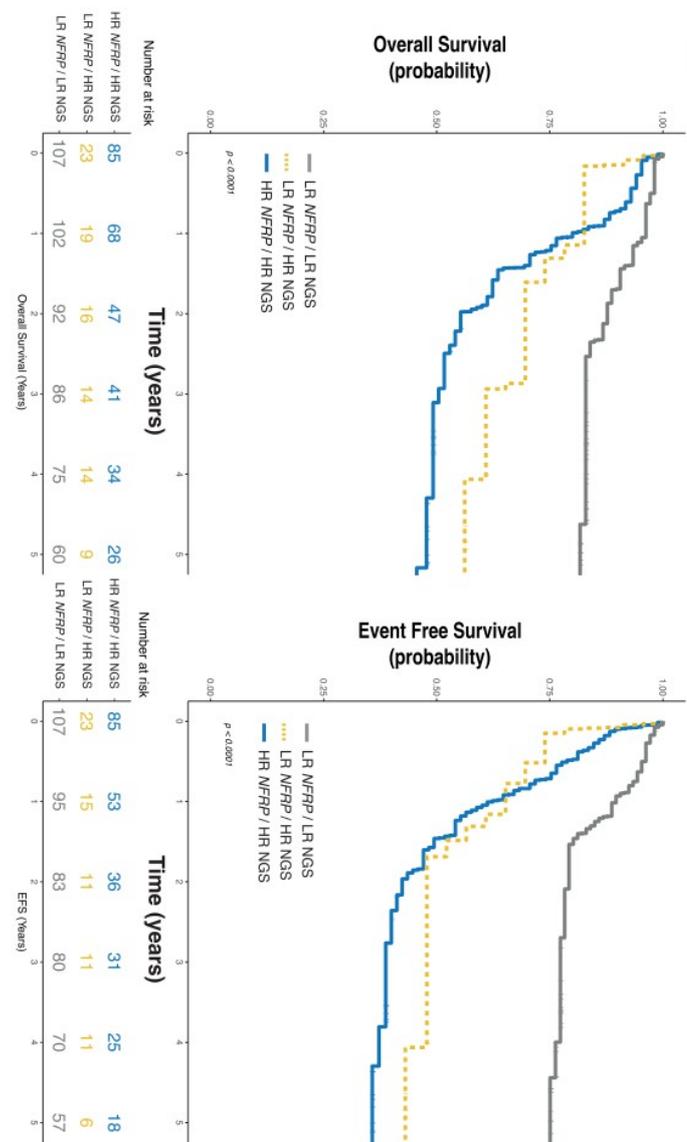
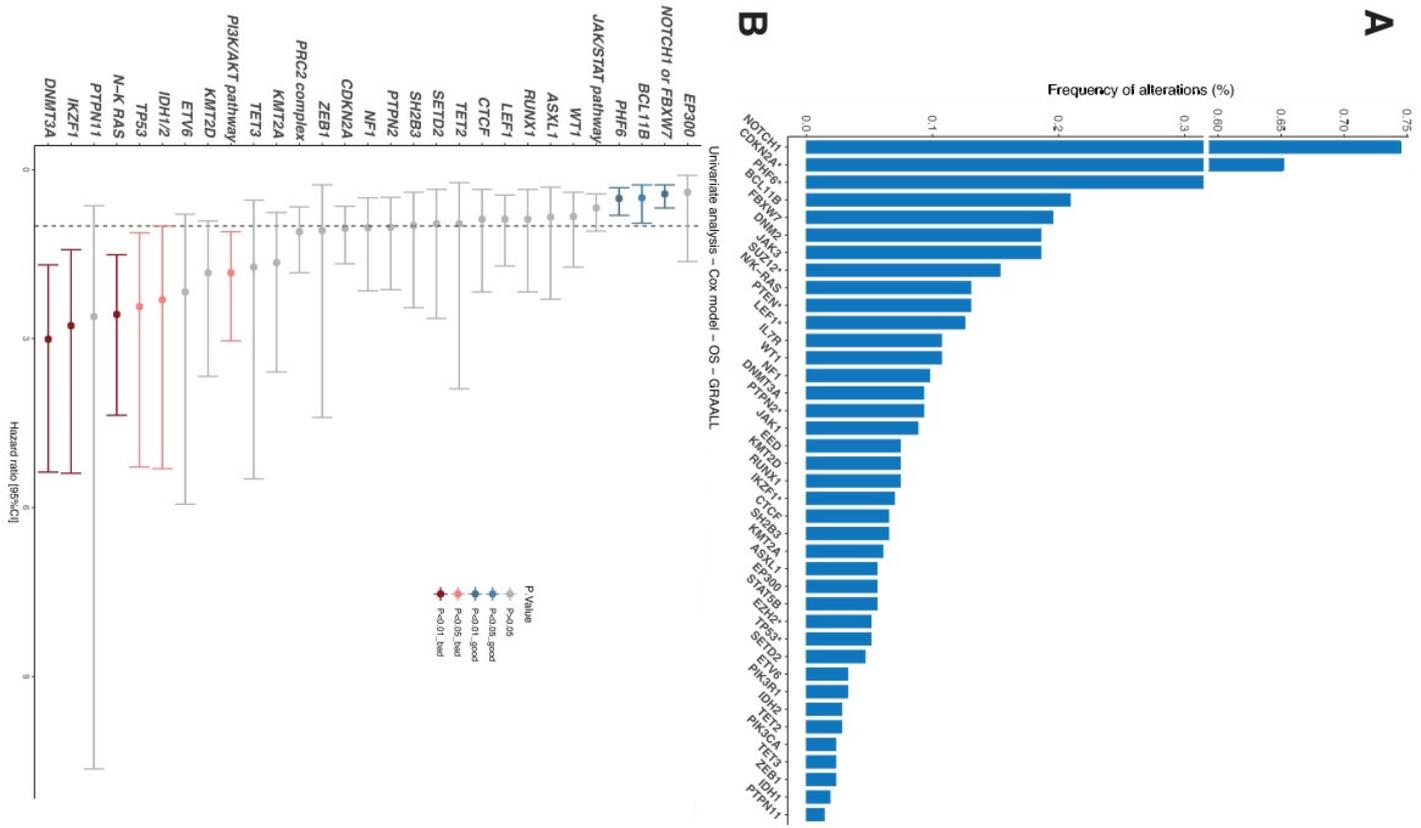


Figure 3.

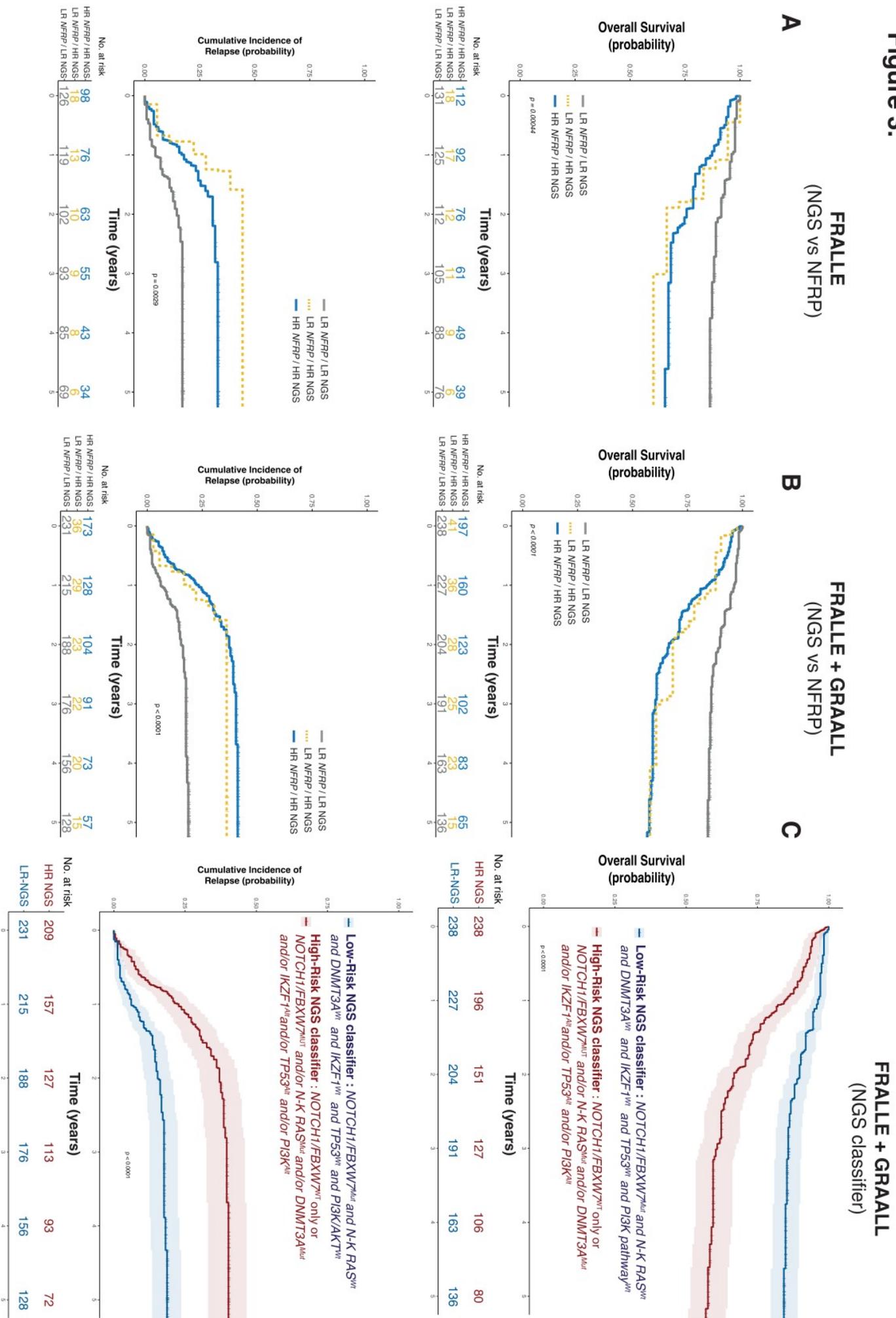
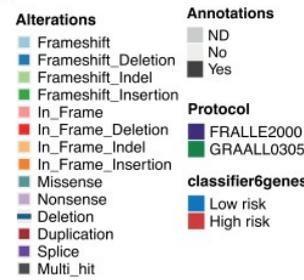
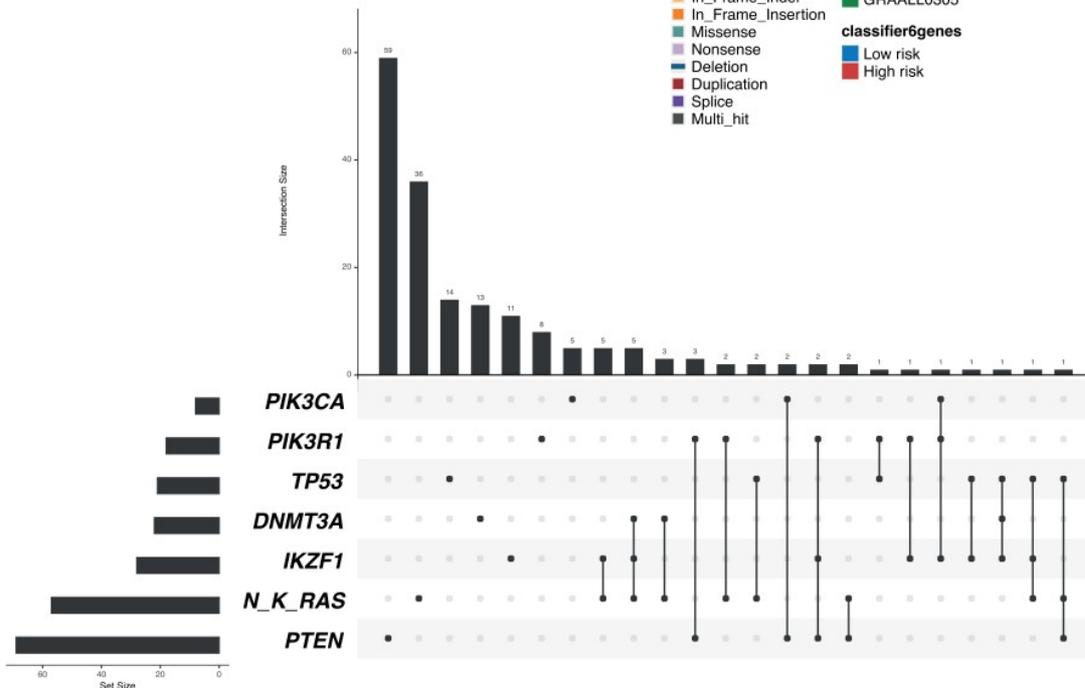


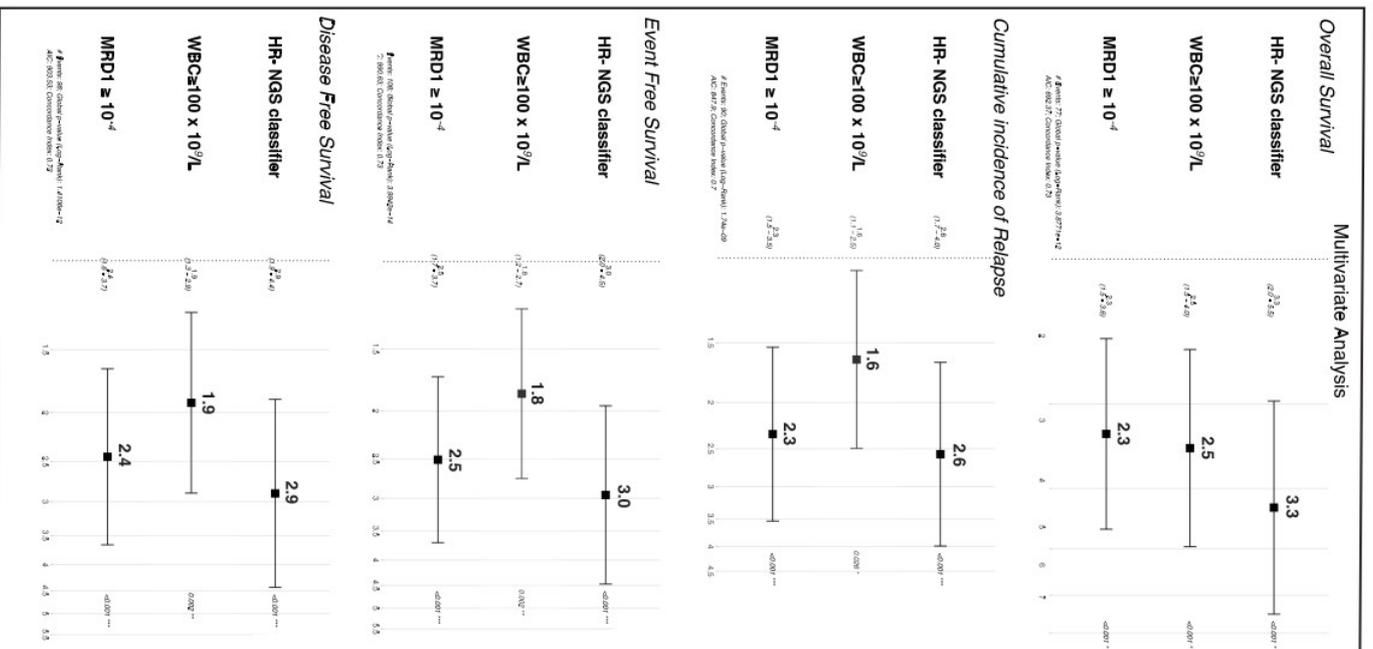
Figure 3.



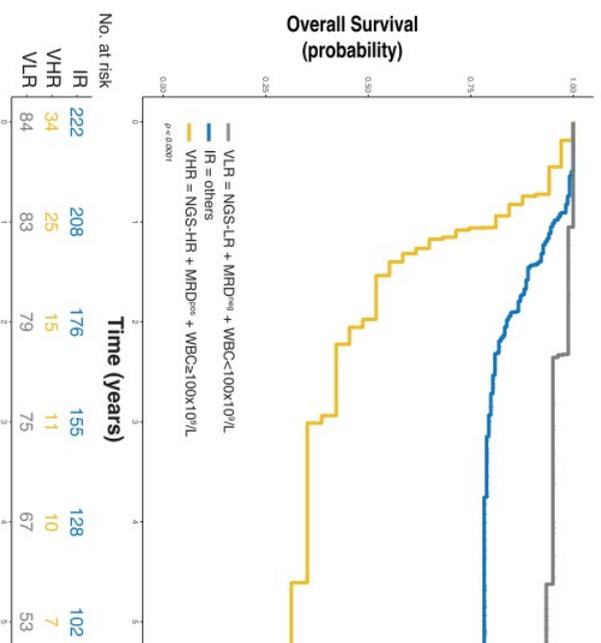
E



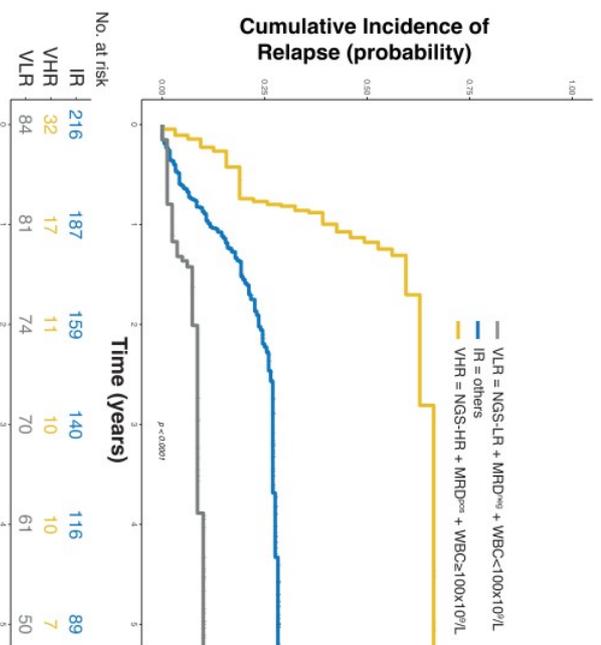
A



B



C



D

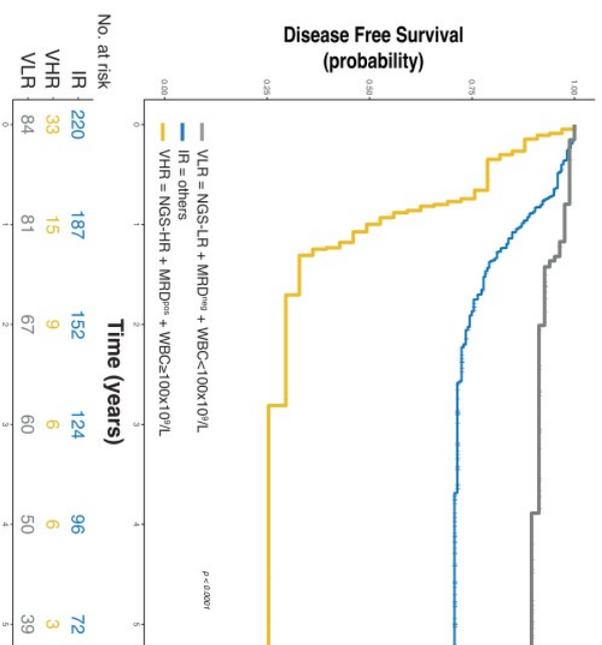
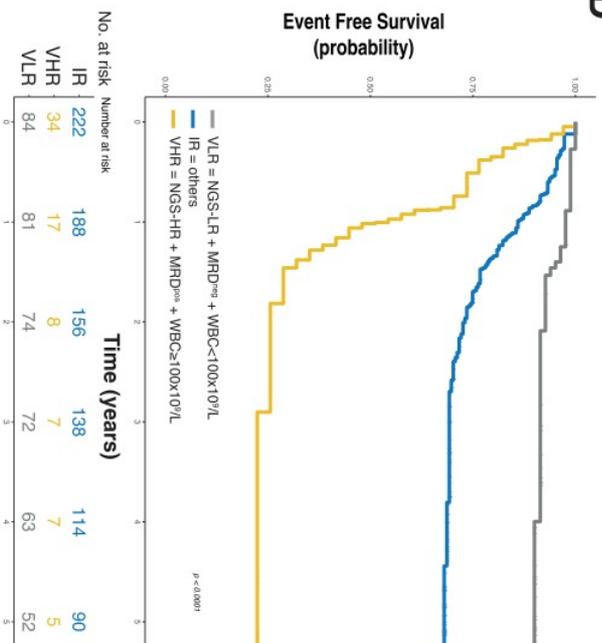


Figure 4.

Supplemental Table 1. Panel NGS genes list

Gene	ENST
AKT1	ENST00000554581_14
ASXL1	ENST00000375687_20
ATM	ENST00000278616_11
BCL11B	ENST00000345514_14
CARD11	ENST00000396946_7
CCR4	ENST00000330953_3
CD58	ENST00000457047_1
CEBPA	ENST00000498907_19
CNOT3	ENST00000406403_19
CTCF	ENST00000264010_16
CXCR4	ENST00000409817_2
DNM2	ENST00000359692_19
DNMT3A	ENST00000264709_2
EED	ENST00000263360_11
EP300	ENST00000263253_22
ETV6	ENST00000396373_12
EZH2	ENST00000320356_7
FAS	ENST00000355740_10
FBXW7	ENST00000281708_4
FLT3	ENST00000241453_13
FYN	ENST00000354650_6
GATA3	ENST00000379328_10
IDH1	ENST00000415913_2
IDH2	ENST00000330062_15
IKZF1	ENST00000331340_7
IL7R	ENST00000303115_5
IRF4	ENST00000380956_6
JAK1	ENST00000342505_1
JAK3	ENST00000458235_19
KIT	ENST00000288135_4
KMT2A	ENST00000534358_11
KMT2D	ENST00000301067_12
KRAS	ENST00000311936_12
LEF1	ENST00000265165_4
NF1	ENST00000358273_17
NOTCH1	ENST00000277541_9
NRAS	ENST00000369535_1
PHF6	ENST00000332070_X
PIK3CA	ENST00000263967_3
PIK3R1	ENST00000521381_5
POT1	ENST00000357628_7
PTEN	ENST00000371953_10
PTPN11	ENST00000351677_12
PTPRC	ENST00000442510_1
RB1	ENST00000267163_13
RELN	ENST00000428762_7
RHOA	ENST00000418115_3
RPL10	ENST00000424325_X
RPL5	ENST00000370321_1
RUNX1	ENST00000344691_21
SETD2	ENST00000409792_3
SF3B1	ENST00000335508_2
SH2B3	ENST00000341259_12
SKP2	ENST00000274255_5
STAT3	ENST00000264657_17
STAT5B	ENST00000293328_17
TAL1	ENST00000294339_1
TBL1XR1	ENST00000457928_3
TET2	ENST00000540549_4
TET3	ENST00000409262_2
TP53	ENST00000269305_17
WT1	ENST00000332351_11
ZRSR2	ENST00000307771_X

Supplemental Table 2. Frequency of alterations detected in 476 T-ALL

	Freq_ped	Freq_adult	Freq_total	fisherTest
NOTCH1	69%	74%	0.71	0.221
CDKN2A	74%	65%	0.70	0.057
FBXW7	22%	20%	0.21	0.572
BCL11B	15%	21%	0.17	0.070
JAK3	13%	19%	0.15	0.075
DNM2	11%	19%	0.15	0.037
PTEN	16%	13%	0.14	0.435
SUZ12	11%	15%	0.13	0.168
LEF1	13%	13%	0.13	1.000
N_K_RAS	11%	13%	0.12	0.571
IL7R	10%	11%	0.10	0.760
WT1	9%	11%	0.10	0.535
PTPN2	7%	9%	0.08	0.303
NF1	5%	10%	0.07	0.078
JAK1	5%	9%	0.07	0.092
STAT5B	7%	6%	0.07	0.576
EZH2	7%	5%	0.06	0.351
RUNX1	5%	7%	0.06	0.449
IKZF1	5%	7%	0.06	0.435
CTCF	5%	7%	0.05	0.420
DNMT3A	1%	9%	0.05	0.000
SH2B3	3%	7%	0.05	0.083
ASXL1	3%	6%	0.04	0.272
TP53	4%	5%	0.04	0.510
EP300	3%	6%	0.04	0.251
<i>EED</i>	1%	7%	0.04	0.001
PIK3R1	4%	3%	0.04	0.637
KMT2D	0%	7%	0.04	0.000
SETD2	3%	5%	0.04	0.322
ETV6	3%	3%	0.03	1.000
<i>KMT2A</i>	1%	6%	0.03	0.001
TET2	2%	3%	0.02	0.555
IDH2	1%	3%	0.02	0.311
TET3	2%	2%	0.02	0.738
PIK3CA	1%	2%	0.02	0.477
PTPN11	2%	1%	0.02	0.735
IDH1	1%	2%	0.01	0.417
ZEB1	0%	2%	0.01	0.096
FLT3	1%	0%	0.01	0.630
GATA3	1%	0%	0.01	0.630
AKT1	0%	1%	0.00	0.203

Supplemental Table 3. (GRAALL) Univariate analysis associated with oncogenic alterations detected with NGS

	SHR_CIR	C95_low	C95_high	P.Value	HR_OS	C95_low	C95_high	P.Value	HR_DFS	C95_low	C95_high	P.Value	HR_EFS	C95_low	C95_high	P.Value
DNMT3A	1.86	0.85	4.08	0.1220	3.01	1.69	5.37	0.0002	2.14	0.93	4.94	0.07478	2.84	1.63	4.93	0.00022
NOTCH1/FBXW7	0.45	0.26	0.76	0.0030	0.43	0.27	0.68	0.0003	0.42	0.26	0.71	0.00090	0.42	0.27	0.64	0.00059
N/K RAS	1.85	0.98	3.46	0.0560	2.57	1.51	4.36	0.0005	2.62	1.5	4.58	0.00074	2.09	1.26	3.45	0.0043
IKZF1	2.1	0.96	4.6	0.0650	2.77	1.42	5.39	0.0028	2	0.96	4.18	0.06509	1.91	0.99	3.67	0.05398
PI3K pathway	0.59	0.36	0.98	0.0410	0.51	0.32	0.81	0.0046	0.67	0.42	1.06	0.08587	0.6	0.4	0.9	0.01299
TP53	1.87	1.07	3.25	0.0280	1.83	1.1	3.04	0.0203	2.24	1.36	3.69	0.00155	1.78	1.12	2.83	1E-02
BCL11B	2.17	0.79	5.97	0.1350	2.43	1.12	5.28	0.0253	1.77	0.64	4.84	0.26942	2.74	1.32	5.65	0.00658
IDH1_2	2.41	0.96	6.01	0.0600	2.31	1	5.31	0.0496	2.17	0.87	5.4	0.09570	2.04	0.94	4.4	0.07049
KMT2D	1.39	0.6	3.23	0.4390	1.83	0.91	3.67	0.0880	0.85	0.34	2.11	0.72008	1.35	0.68	2.69	0.39003
JAK/STAT	0.78	0.47	1.3	0.3470	0.68	0.43	1.09	0.1103	0.95	0.6	1.52	0.84344	0.86	0.57	1.3	0.47696
ETV6	0.74	0.1	5.31	0.7610	2.17	0.79	5.94	0.1316	0.54	0.07	3.88	0.53803	1.77	0.65	4.83	0.26159
PTPN11	1.5	0.21	10.85	0.6860	2.61	0.64	10.64	0.1808	1.01	0.14	7.25	0.99492	1.86	0.46	7.55	0.38565
EP300	0.22	0.03	1.61	0.1370	0.4	0.1	1.63	0.2002	0.46	0.11	1.87	0.27612	0.48	0.15	1.5	0.20484
KMT2A	1.31	0.52	3.25	0.5670	1.65	0.76	3.59	0.2043	1.52	0.66	3.5	0.32890	1.56	0.76	3.21	0.23019
TE73	2.25	0.7	7.19	0.1710	1.73	0.54	5.49	0.3535	1.41	0.34	5.79	0.63112	1.47	0.46	4.65	0.51212
WT1	0.83	0.36	1.93	0.6700	0.83	0.4	1.73	0.6263	0.87	0.42	1.82	0.71362	0.8	0.4	1.58	0.51387
LEF1	0.88	0.42	1.84	0.7280	0.88	0.45	1.71	0.7080	0.75	0.38	1.52	0.42909	0.76	0.41	1.43	0.39306
PRC2	1.22	0.7	2.1	0.4830	1.1	0.66	1.83	0.7113	1.2	0.72	2	0.49620	1.06	0.67	1.69	8.00E-01
ASXL1	1.33	0.53	3.31	0.5440	0.84	0.31	2.3	0.7356	0.82	0.3	2.26	0.70758	0.84	0.34	2.07	0.70703
CTCF	1.08	0.43	2.69	0.8690	0.88	0.35	2.17	0.7776	0.83	0.33	2.05	0.68071	0.82	0.36	1.87	0.63622
RUNX1	0.57	0.18	1.82	0.3440	0.88	0.35	2.17	0.7788	0.49	0.15	1.56	0.22639	0.66	0.27	1.63	0.37348
CDKN2A	1.16	0.68	1.96	0.5890	1.04	0.65	1.67	0.8645	1.1	0.67	1.81	0.70339	0.98	0.64	1.49	0.92545
ZEB1	1.31	0.32	5.38	0.7030	1.08	0.27	4.4	0.9125	1.04	0.26	4.25	0.95388	0.83	0.2	3.37	0.79563
NF1	0.73	0.29	1.81	0.4900	1.03	0.5	2.15	0.9294	0.76	0.33	1.75	0.52140	0.74	0.45	1.78	0.75515
SETD2	0.52	0.13	2.15	0.3700	0.96	0.35	2.64	0.9428	0.69	0.22	2.19	0.52711	0.74	0.27	2	0.54703
PTPN2	0.89	0.38	2.07	0.7900	1.02	0.49	2.13	0.9495	1.01	0.48	2.1	0.98019	0.93	0.47	1.84	0.82707
TE72	1.09	0.27	4.48	0.9000	0.96	0.23	3.89	0.9498	0.99	0.24	4.05	0.98794	0.71	0.18	2.9	0.63747
SH2B3	1.01	0.37	2.77	0.9900	0.99	0.4	2.45	0.9812	1.07	0.39	2.93	0.89724	1.23	0.57	2.66	0.5958

Supplemental Table 4. (GRAALL) Comparaison NFRP vs NGS-based classifier

OS							
	HR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	2,80	1,79	4,39	0,36	0,23	0,56	< 0.001
NGS classifier	3,88	2,33	6,45	0,26	0,15	0,43	< 0.001

EFS							
	HR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	2,78	1,85	4,18	0,36	0,24	0,54	< 0.001
NGS classifier	3,59	2,29	5,62	0,28	0,18	0,44	< 0.001

DFS							
	HR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	3,18	2,00	5,07	0,31	0,2	0,5	< 0.001
NGS classifier	3,2	1,96	5,22	0,31	0,19	0,51	< 0.001

CIR							
	SHR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	3,01	1,83	4,97	0,33	0,2	0,55	< 0.001
NGS classifier	2,8	1,66	4,73	0,36	0,21	0,6	< 0.001

Supplemental Table 5. (FRALLE) Comparaison NFRP vs NGS-based classifier

OS							
	HR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	2.26	1.35	3.78	0.44	0.26	0.74	0.0019
NGS classifier	2.88	1.65	5.03	0.35	0.20	0.60	0.0002

EFS							
	HR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	2.40	1.57	3.69	0.42	0.27	0.64	0.0001
NGS classifier	2.71	1.73	4.25	0.37	0.24	0.58	0.0000

DFS							
	HR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	2.14	1.34	3.41	0.47	0.29	0.74	0.0014
NGS classifier	2.64	1.61	4.31	0.38	0.23	0.62	0.0001

CIR							
	SHR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	1.76	1.07	2.88	0.57	0.35	0.93	0.0251
NGS classifier	2.27	1.36	3.80	0.44	0.26	0.74	0.0017

Supplemental Table 6. Comparison NFRP vs NGS-based classifier

OS							
	HR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	2.55	1.82	3.59	0.39	0.28	0.55	< 0.001
NGS classifier	3.40	2.34	4.95	0.29	0.20	0.43	< 0.001

EFS							
	HR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	2.60	1.93	3.49	0.39	0.29	0.52	< 0.001
NGS classifier	3.13	2.28	4.31	0.32	0.23	0.44	< 0.001

DFS							
	HR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	2.62	1.88	3.64	0.38	0.27	0.53	< 0.001
NGS classifier	2.91	2.06	4.12	0.34	0.24	0.49	< 0.001

CIR							
	SHR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
Classifier_NFRP	2.30	1.62	3.27	0.43	0.31	0.62	< 0.001
NGS classifier	2.52	1.75	3.64	0.40	0.27	0.57	< 0.001

Supplemental Table 7. Multivariate Analysis_NGS classifier_MRD_WBC_100 (trial stratified)

OS							
	HR_OS	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
NGS_classifier	3.29	1.97	5.48	0.30	0.18	0.51	0.000
WBC > 100e9/L	2.47	1.54	3.97	0.40	0.25	0.65	0.000
MRD1>e.4	2.31	1.46	3.65	0.43	0.27	0.68	0.000
EFS							
	HR_EFS	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
NGS_classifier	2.96	1.95	4.47	0.34	0.22	0.51	0.000
WBC > 100e9/L	1.85	1.25	2.74	0.54	0.36	0.80	0.002
MRD1>e.4	2.51	1.71	3.69	0.40	0.27	0.59	0.000
DFS							
	HR_DFS	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
NGS_classifier	2.89	1.88	4.44	0.35	0.23	0.53	0.000
WBC > 100e9/L	1.91	1.27	2.89	0.52	0.35	0.79	0.002
MRD1>e.4	2.44	1.64	3.65	0.41	0.27	0.61	0.000
CIR							
	SHR_CIR	Lower_CI	Upper_CI	Inv_HR	Inv_Lower_CI	Inv_Upper_CI	p
NGS_classifier	2.57	1.65	3.99	0.39	0.25	0.61	0.000
WBC > 100e9/L	1.63	1.06	2.50	0.61	0.40	0.94	0.026
MRD1>e.4	2.33	1.53	3.54	0.43	0.28	0.65	0.000

Supplemental Table 8. Survival Outcomes NGS MRD WBC combined

OS

NGS_MRD_WBC_classifier	Outcome at 5 years	p-value
VLR	93% (88%, 99%)	<0.001
IR	78% (73%, 84%)	
VHR	31% (18%, 53%)	

EFS

NGS_MRD_WBC_classifier	Outcome at 5 years	p-value
VLR	90% (84%, 97%)	<0.001
IR	68% (62%, 75%)	
VHR	22% (12%, 43%)	

DFS

NGS_MRD_WBC_classifier	Outcome at 5 years	p-value
VLR	90% (83%, 97%)	<0.001
IR	71% (65%, 77%)	
VHR	25% (14%, 47%)	

CIR

NGS_MRD_WBC_classifier	Outcome at 5 years	p-value
VLR	10% (3%, 16%)	<0.001
IR	28% (22%, 34%)	
VHR	66% (44%, 80%)	

Supplemental Table 9. Clinical characteristics of VHR, VLR and IR T-ALL patients (NGS, WBC and MRS)

Clinical characteristics	VHR (N=34)	IR (N=222)	VLR (N=84)	Total (N=340)	p value
Male					0.322
0	6 (17.6%)	52 (23.4%)	25 (29.8%)	83 (24.4%)	
1	28 (82.4%)	170 (76.6%)	59 (70.2%)	257 (75.6%)	
CNS involvement					0.089
N-Miss					
0	27 (79.4%)	200 (90.1%)	78 (92.9%)	305 (89.7%)	
1	7 (20.6%)	22 (9.9%)	6 (7.1%)	35 (10.3%)	
Age at diagnosis					0.006
Median (Q1, Q3)	12.875 (5.604, 16.562)	12.750 (7.792, 22.229)	17.833 (10.167, 34.813)	13.708 (8.167, 23.478)	
WBC at diagnosis					< 0.001
Median (Q1, Q3)	199.500 (140.100, 339.000)	92.400 (23.325, 188.000)	28.800 (13.310, 57.938)	69.850 (21.900, 170.575)	
Trial					0.004
FRALLE2000	26 (76.5%)	151 (68.0%)	42 (50.0%)	219 (64.4%)	
GRAALL0305	8 (23.5%)	71 (32.0%)	42 (50.0%)	121 (35.6%)	
Corticosenitivity					< 0.001
N-Miss					
0	1	4	0	5	
1	28 (84.8%)	100 (45.9%)	16 (19.0%)	144 (43.0%)	
Complete Remission					0.136
0	5 (15.2%)	118 (54.1%)	68 (81.0%)	191 (57.0%)	
1	2 (5.9%)	6 (2.7%)	0 (0.0%)	8 (2.4%)	
1	32 (94.1%)	216 (97.3%)	84 (100.0%)	332 (97.6%)	
Chimiosensitivity					0.003
N-Miss					
0	1	3	0	4	
1	13 (39.4%)	56 (25.6%)	10 (11.9%)	79 (23.5%)	
1	20 (60.6%)	163 (74.4%)	74 (88.1%)	257 (76.5%)	
MRD\geq10⁻⁴					< 0.001
N-Miss					
0	0 (0.0%)	133 (59.9%)	84 (100.0%)	217 (63.8%)	
1	34 (100.0%)	89 (40.1%)	0 (0.0%)	123 (36.2%)	
Allograft					0.035
N-Miss					
0	0	6	0	6	
1	24 (70.6%)	170 (78.7%)	75 (89.3%)	269 (80.5%)	
1	10 (29.4%)	46 (21.3%)	9 (10.7%)	65 (19.5%)	
Relapse					< 0.001
0	12 (37.5%)	155 (71.8%)	75 (89.3%)	242 (72.9%)	
1	20 (62.5%)	61 (28.2%)	9 (10.7%)	90 (27.1%)	
Oncogenetic classification					
TLX1					< 0.001
N-Miss					
0	3	24	12	39	
1	31 (100.0%)	182 (91.9%)	53 (73.6%)	266 (88.4%)	
1	0 (0.0%)	16 (8.1%)	19 (26.4%)	35 (11.6%)	
TLX3					0.449
N-Miss					
0	3	24	12	39	
1	27 (87.1%)	156 (78.8%)	60 (83.3%)	243 (80.7%)	
1	4 (12.9%)	42 (21.2%)	12 (16.7%)	58 (19.3%)	
SIL-TAL1					< 0.001
N-Miss					
0	3	24	12	39	
1	19 (61.3%)	167 (84.3%)	69 (95.8%)	255 (84.7%)	
1	12 (38.7%)	31 (15.7%)	3 (4.2%)	46 (15.3%)	
CALM_AF10					0.39
N-Miss					
0	3	24	12	39	
1	31 (100.0%)	191 (96.5%)	71 (98.6%)	293 (97.3%)	
1	0 (0.0%)	7 (3.5%)	1 (1.4%)	8 (2.7%)	
Immunophenotype					
ETP					0.015
N-Miss					
0	11	90	30	131	
1	22 (95.7%)	106 (80.3%)	51 (94.4%)	179 (85.6%)	
1	1 (4.3%)	26 (19.7%)	3 (5.6%)	30 (14.4%)	
IM					0.003
N-Miss					
0	2	27	9	38	
1	28 (87.5%)	151 (77.4%)	71 (94.7%)	250 (82.8%)	
1	4 (12.5%)	44 (22.6%)	4 (5.3%)	52 (17.2%)	
CORTICAL					< 0.001
N-Miss					
0	2	27	9	38	
1	22 (68.8%)	106 (54.4%)	14 (18.7%)	142 (47.0%)	
1	10 (31.2%)	89 (45.6%)	61 (81.3%)	160 (53.0%)	
MATUREAB					< 0.001
N-Miss					
0	2	27	9	38	
1	19 (59.4%)	164 (84.1%)	70 (93.3%)	253 (83.8%)	
1	13 (40.6%)	31 (15.9%)	5 (6.7%)	49 (16.2%)	
MATUREGD					0.131
N-Miss					
0	2	27	9	38	
1	27 (84.4%)	164 (84.1%)	70 (93.3%)	261 (86.4%)	
1	5 (15.6%)	31 (15.9%)	5 (6.7%)	41 (13.6%)	

Partie 2) De l'identification des altérations oncogéniques dans les LAL-T à la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Article 4. TP53, NOTCH1 et Ferroptose dans les LAL-T

Dans ce travail (en cours de révision dans *Blood*), l'objectif initial était d'explorer l'incidence et l'impact pronostique associés aux altérations de *TP53* (*TP53^{Alt}*) dans les LAL-T et d'évaluer la sensibilité des LAL-T *TP53^{Alt}* à l'APR-246, une molécule de synthèse ayant la capacité de restaurer de la fonction physiologique de p53.

Nous avons exploré dans un 1^o temps l'incidence et l'impact pronostique en lien avec la présence d'altérations de *TP53* dans notre cohorte de 476 LAL-T adultes et pédiatriques.

Les *TP53^{Alt}* sont retrouvées dans 4% des LAL-T (21/476) parmi lesquelles 6 mutations (29%) et 12 délétions (57%), alors que 3 patients (14%) présentaient une double inactivation de p53.

La présence de *TP53^{Alt}* est associée à un pronostic péjoratif avec une survie globale diminuée (OS à 5 ans de 48% vs. 72% ; HR : 2.34, IC95% (1.30 - 4.24); $p = 0.005$) également en analyse multivariée incluant le classifieur *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* (HR: 2.87, 95%CI (1.56 - 5.26); $p = 0.001$).

Comme attendu les LAL-T *TP53^{Mut}* étaient sensibles à l'APR-246 à la fois sur 4 lignées cellulaires de LAL-T *TP53^{Mut}* et 5 PDX *TP53^{Mut}* incluant 2 rechutes. L'ajout d'APR-246 permettait également de restaurer la chimiosensibilité aux anthracyclines en présence de *TP53^{Mut}*.

De façon particulièrement intéressante et inattendue, nous avons également rapporté que les LAL-T *TP53^{WT}* présentaient une sensibilité hétérogène mais significative à l'APR-246. Afin d'identifier les déterminants oncogéniques qui conditionnaient la sensibilité à l'APR-246 parmi les LAL-T *TP53^{WT}* nous avons comparé le profil mutationnel de 18 PDX de LAL-T *TP53^{WT}* traitées *ex vivo*. Il est apparu que le facteur commun aux LAL-T sensible à l'APR-246 était la présence d'une activation de la voie NOTCH1. Pour renforcer l'hypothèse que NOTCH1 était bien le facteur responsable de la sensibilité à l'APR-246 nous avons créé un modèle transgénique de LAL-T. A partir d'un échantillon de LAL-T *NOTCH1^{WT}*, résistant à l'APR-

246, nous avons généré par un système CRISPR/Cas9 une mutation de type PEST. Nous avons ensuite confirmé que l'activation de la voie NOTCH1 s'accompagnait d'une augmentation de la sensibilité à l'APR-246 dans ce modèle.

D'un point de vue fonctionnel, cette sensibilité accrue à l'APR-246 en cas d'activation de la voie NOTCH1 est en rapport avec l'induction d'une mort cellulaire alternative appelée Ferroptose. Cette dernière repose sur la capacité de la cellule à réguler les dérivés réactifs de l'oxygène générés par la peroxydation des lipides membranaires. Ce mécanisme de détoxification est tributaire du contenu intracellulaire en glutathion et donc finement régulé par le métabolisme intracellulaire. L'APR-246 possède une activité p53-indépendante qui conduit à induire la ferroptose via la déplétion en glutathion. NOTCH1 étant lui-même responsable d'une polarisation glutaminolytique du métabolisme cellulaire diminuant ainsi la part de glutamine disponible à la biosynthèse du glutathion. La combinaison de ces 2 facteurs permet d'expliquer la grande sensibilité des LAL-T *NOTCH1*^{Mut} à l'APR-246.

Ainsi, au-delà des LAL-T *TP53*^{Mut} qui sont particulièrement rares, nous proposons que les LAL-T *NOTCH1*^{Mut} (plus de 70% des LAL-T) pourraient également bénéficier de l'APR-246. A noter qu'un certain d'hémopathies en dehors des LAL-T présentent également une activation dérégulée de la voie *NOTCH1* (lymphome du manteau, leucémie lymphoïde chronique...) mais également certaines tumeurs solides (cancers du sein par exemple) laissant présager un large champ d'indications thérapeutiques à évaluer pour cette molécule dont l'activité p53-indépendante ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques intéressantes.

Article IV

Titre :

TP53 and *NOTCH1* alterations induce vulnerability to APR-246 in T-ALL

Co-auteurs :

Mathieu Simonin*, Guillaume P. Andrieu*, Rudy Birsén, Marie Balsat, Guillaume Hypolite, Lucien Courtois, Carlos Graux, Nathalie Gardel, Jean-Michel Cayuela, Françoise Huguet, Yves Chalandon, Yannick Le Bris, Elizabeth Macintyre, Virginie Gandemer, Arnaud Petit, Philippe Rousselot, André Baruchel, Didier Bouscary, Olivier Hermine, Nicolas Boissel, Vahid Asnafi.

*co-premier auteur

État de article :

En cours de révision.

Nom de la revue :

Blood

Année de Publication :

-

TP53 and NOTCH1 alterations induce vulnerability to APR-246 in T-ALL

Running Title: Notch1 activation increases sensitivity to APR-246 in T-ALL

Mathieu Simonin^{*1,2,3}, Guillaume P. Andrieu^{*1,2}, Rudy Birsén⁴, Marie Balsat⁵,
Guillaume Hypolite^{1,2}, Lucien Courtois^{1,2}, Carlos Graux⁶, Nathalie Gardel⁷, Jean-
Michel Cayuela⁸, Françoise Huguet⁹, Yves Chalandon^{10,11}, Yannick Le Bris¹²,
Elizabeth Macintyre^{1,3}, Virginie Gandemer¹³, Arnaud Petit³, Philippe Rousselot¹⁴,
André Baruchel¹⁵, Didier Bouscary⁴, Olivier Hermine¹⁶, Nicolas Boissel¹⁷, Vahid
Asnafi^{1,2§}

Affiliations

¹ Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker Enfants-Malades, Université de Paris, Paris, France

² Institut Necker-Enfants Malades (INEM), Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) U1151

³ Department of Pediatric Hematology and Oncology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Armand Trousseau Hospital, Sorbonne Université, Paris, France

⁴ Université de Paris, Institut Cochin, CNRS UMR8104, INSERM U1016, Paris, France, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Centre-Université de Paris, Service d'Hématologie clinique, Hôpital Cochin

⁵ Hospices Civils de Lyon, Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France

⁶ CHU UCL Namur – Godinne, service d'Hématologie, Yvoir, Belgique

⁷ Laboratory of Hematology, CHRU Lille, Lille, France and U1172, INSERM, LILLE, France

⁸ Hematology Laboratory and EA3518, University Hospital Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France

⁹ Department of Hematology, CHRU - Institut Universitaire de Cancer Toulouse - Oncopole, Toulouse, France

¹⁰ Division of Hematology, Department of Oncology, University Hospital of Geneva and Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland

¹¹ Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK), Bern, Switzerland

¹² Hematology Biology, Nantes University Hospital & CRCINA, Nantes, France

¹³ Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital of Rennes, France

¹⁴ Hemato-Oncology Unit, Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay, France ; Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, UMR1184 Université Paris-Saclay, Communauté Paris-Saclay, France

¹⁵ Department of Pediatric Hematology and Immunology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Robert Debré Hospital, University Paris Diderot, Paris, France

¹⁶ Department of Hematology, Inserm U1163, IMAGINE Institute, Paris University, Necker Hospital, Paris, France

¹⁷ Université Paris Diderot, Institut Universitaire d'Hématologie, EA-3518, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, University Hospital Saint-Louis, Paris, France.

46 *co-first authors

47 §Corresponding author

48

49 **Keywords:** *NOTCH1*, *TP53*, Ferroptosis, T-ALL, APR-246

50

51 **Corresponding author:**

52 Vahid Asnafi, Laboratory of Onco-Hematology, Necker-Enfants Malades Hospital, 149

53 rue de Sèvres, 75015 Paris, France. E-mail: vahid.asnafi@aphp.fr; Phone:

54 +33.144.49.49.14

55

56 **Word count (excluding references):**

57 **Abstract:** 173 words

58 **Main text:** 3602 words

59

60 **Number of Figures/Tables:** 4 Figures + 1 Table

61 **Number of Supplementary Figures/Tables:** 6 Figures + 3 Tables

62 **Number of references:** 38

63

64 **Key points**

65 1- T-ALL harboring *TP53* alterations are associated with poor prognosis and

66 exhibited sensitivity to APR-246

67 2- Notch1 activation conveys sensitivity to APR-246 by eliciting a susceptibility to

68 ferroptosis-induced cell death in *TP53* GL T-ALL

69

70 **Abstract**

71 T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a class of aggressive hematological
72 malignancies associated with poor clinical outcome. *TP53* alterations (*TP53^{Alt}*) were
73 rarely identified in T-ALL at diagnosis and their prognostic impact remains unclear. In
74 a cohort of 476 adult and pediatric T-ALL, *TP53^{Alt}* were observed in 4% of cases at
75 diagnosis and were associated with chemoresistance and poor prognosis. As
76 expected, APR-246, a small compound that restores wild-type configuration to
77 mutated p53, showed efficacy in T-ALL harboring *TP53* mutations. More importantly,
78 in *TP53* germline T-ALL, Notch1 pathway gain of function mutations were associated
79 with substantial sensitivity to APR-246. Mechanistically, Notch1 activation *via*
80 ferroptosis induction led to preferential APR-246 sensitivity. Given that oncogenic
81 activation of the Notch1 pathway is present in more than 70% of T-ALLs, these
82 observations pave the way for promising perspectives in T-ALL treatment which could
83 benefit from the Achilles heel associated with Notch1 activation sensitizing leukemia
84 cells to APR-246-induced ferroptosis. These observations pave the way for the use of
85 APR-246 beyond *TP53* alterations in T-ALL and possibly other Notch1-driven cancers.

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96 **Introduction**

97 Among hematological malignancies, T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)
98 represents a class of aggressive tumors with dismal clinical outcome. While the
99 intensification of multi-agent chemotherapy protocols has dramatically improved
100 prognosis, refractory and relapsed cases are clinically challenging due to limited
101 therapeutic options.^{1,2} p53 is a transcription factor and a master tumor suppressor
102 gene frequently altered in cancer.³ In contrast to carcinomas and other hematological
103 malignancies, *TP53* alterations (*TP53^{Alt}*), encompassing mutations (*TP53^{Mut}*) and/or
104 pan-exon deletions (*TP53^{Del}*), are remarkably rare at diagnosis in T-ALL, and their
105 clinical implication remains elusive.⁴⁻⁶ Critically, *TP53^{Alt}* have been reported to be
106 acquired in up to 20% of the relapsed T-ALL cases, when they convey a deleterious
107 prognosis.⁷⁻⁹ A seducing hypothesis to explain the scarcity of *TP53^{Alt}* in T-ALL stems
108 from the intricate cross-regulation of the p53, CDKN2A/ARF and Notch1 pathways.
109 Most T-ALL harbor genetic alterations of *NOTCH1*, leading to constitutive Notch1
110 signaling.¹⁰ Several studies showed that Notch1 regulates the p53 pathway¹¹. The
111 Notch1 intracellular domain (ICN1) can form a complex with p53 to block its
112 transactivation.¹² CDKN2A/p14^{ARF} binds to MDM2, the E3 ubiquitin ligase of p53, and
113 disrupts the interaction between MDM2 and p53, preventing p53 ubiquitination and
114 degradation. The *CDKN2A* locus, which encodes the p53 regulator p14^{ARF}, is
115 frequently deleted in T-ALL. Notch1 also downregulates p14^{ARF}.^{13,14} Notch1-mediated
116 activation of PI3K/Akt signaling increases MDM2 activity and reduces p53 function. As
117 such, the main genetic lesions in T-ALL all downregulate p53 function, even in the
118 absence of *TP53* alterations. These observations position the interplay between the
119 p53 and Notch1 pathways as a potential target to treat T-ALL. Indeed, the restoration
120 of wild-type p53 function in a Notch1-altered context could represent an elegant

121 strategy to counter T-ALL progression. APR-246, a small molecule targeting p53, has
122 shown impressive results in *TP53^{Mut}* cancers. It interacts with mutated p53 to restore
123 its wild-type (WT) conformation and function.^{15,16} APR-246 also exerts a p53-
124 independent function on the reactive oxygen species (ROS) balance, by increasing
125 ROS through depletion of the glutathione (GSH) pool, thus inducing ferroptosis, a
126 regulated cell death program triggered in the event of oxidative stress response failure
127 ^{17,18}.

128 Here, we produce the first comprehensive analysis of *TP53^{Alt}* and the associated
129 oncogenetic landscape in an extensive cohort of 476 patients newly diagnosed with
130 T-ALL. *TP53^{Alt}* were observed in 4% of T-ALL at diagnosis and were associated with
131 poor prognosis. We provide a basis for targeting p53-mutated T-ALL using the novel
132 small molecule APR-246. Critically, we demonstrate that APR-246 also has a clear
133 efficacy on *TP53^{WT} NOTCH1^{Mut}* T-ALL, thus identifying p53-unrelated functions in T-
134 ALL.

135

136

137

138

139

140

141 **Methods**

142 **Patients and primary samples**

143 Adult patients were enrolled in the GRAALL-2003-2005 trials (GRAALL-2003,
144 NCT00222027; GRAALL-2005, NCT00327678) and pediatric patients were enrolled
145 in the FRALLE 2000 trial. Based on DNA availability for molecular analysis, 215 adult
146 patients out of 337 and 261 pediatric patients out of 405 were included in this study.
147 No difference in clinical outcomes was observed between the included patients and
148 the entire cohort (data not shown). Diagnostic peripheral blood or bone marrow
149 samples were collected after informed consent was obtained at diagnosis, according
150 to the Declaration of Helsinki. All samples contained $\geq 80\%$ blasts, immunophenotypic
151 and molecular characterization of T-ALL samples, minimal residual disease (MRD)
152 assessment, gene mutation screening, MLPA were performed as previously described
153 ¹⁹⁻²¹.

154 **Next-generation sequencing, copy number and molecular analysis**

155 Genomic analysis was performed by pan-exon targeted next-generation sequencing
156 (NGS) of DNA extracted from diagnostic samples; DNA libraries were prepared using
157 Nextera XT kit (Illumina) and sequenced on an Illumina MiSeq. The NGS panel
158 included 69 genes known to be mutated in T-ALL. NGS analysis was performed with
159 Polyweb software (Imagine Institute). Genetic lesion co-occurrences and mutual
160 exclusions were computed using the DISCOVER R package.

161 **Copy number evaluation from next-generation sequencing (NGS) data**

162 We performed a computational approach previously described for the detection of
163 copy number variants (CNVs) from next-generation sequence data,²² including
164 systematic analysis of the depth of *TP53* gene coverage. This is based on variations

165 in depth of coverage of aligned sequence reads, using a locally developed algorithm.
166 The CNVs detected were confirmed by high-resolution CGH and/or MLPA analysis (kit
167 P037-CLL-1 MRC-Holland).

168 **Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (array CGH)**

169 Diagnostic DNA was hybridized on Affymetrix (Santa Clara, CA) Cytogenetics whole
170 Genome 2.7M Arrays (CGH-array), according to the manufacturer's
171 recommendations. Data analysis was performed with the Chromosome Analysis Suite
172 (ChAS) software (Affymetrix®). Gene copy number (GCN) aberrations were compared
173 with the Database of Genomic variants (DGV) <http://projects.tcag.ca/variation> to study
174 only non-variant GCV aberrations.

175 **Cell lines, culture conditions, and treatments**

176 The T-ALL cell lines Loucy, CEM, RPMI, PEER, MOLT-4 and SIL-ALL were grown in
177 RPMI-1640 supplemented with 50 µg/mL streptomycin, 50 UI penicillin, 4 mM L-
178 glutamine and 10% fetal bovine serum (complete medium). Cell lines were
179 authenticated by the ATCC. For *ex vivo* experiments, PDX were cultured in complete
180 medium, supplemented with 50 ng/ml human stem cell factor, 20 ng/ml hFLT3-L, 10
181 ng/ml hIL-7 and 20 nM insulin (MiltenyiBiotec). Cultures were maintained at 37°C in a
182 humidified atmosphere containing 5% CO₂. For treatment, cells or PDX were
183 incubated with increasing doses of APR-246 for 48 hours. APR-246 was obtained from
184 AbMole BioScience (Houston, TX). Doxorubicin and etoposide were obtained from
185 Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO).

186 **Patient-derived xenografts**

187 Patient-derived xenografts (PDXs) were generated from primary T-ALL samples as
188 described.²³ Briefly, 106 viable leukemic cells were xenografted by intravenous retro-
189 orbital injection in 2-month-old NSG mice. Mice were monitored weekly by flow

190 cytometry for the leukemic load (FSChi, hCD7+, hCD45+ cells) in peripheral blood.
191 Mice were euthanized when terminally ill, as evidenced by either severe dyspnea or
192 weakness caused by leukemic dissemination in the thymus or vital organs. Bone
193 marrows from tibiae, hip, femora and vertebrae were collected for subsequent ex vivo
194 experiments. All samples used contained $\geq 90\%$ blasts.

195 **Generation of T-ALL PDX with *NOTCH1-PEST* mutation via CRISPR/Cas9**
196 **technology**

197 UNT525 *NOTCH1-PEST* mutation was constructed by the Alt-R CRISPR-Cas9
198 system (Integrated DNA Technologies, Inc.) Three different guide RNAs specific to
199 *NOTCH1* were screened and the oligo ACGTCGCTGCCATCCTCGCTG was chosen
200 for further transfection experiments in UPNT525 PDX T-ALL. Indel mutations within
201 the PEST domain were confirmed by NGS. hCD45+ T-ALL cells of UPNT525 PDX
202 were electroporated with Cas9-gRNA ribonucleoprotein complexes for *NOTCH1-*
203 *PEST* knock-in. gRNAs were synthesized from Integrated DNA Technologies as Alt-R
204 CRISPR-Cas9 crRNA. The functional gRNA was created after annealing with Alt-R
205 tracrRNA (Integrated DNA Technologies). Editing efficiency evaluated with TIDE
206 algorithm (<https://tide.nki.nl/>) was around 75%.

207 **Flow cytometry-based assay**

208 Data acquisition and data analysis were conducted at the INEM institute. Cell viability
209 was determined by flow cytometry by Annexin V-APC/propidium iodide co-staining
210 (BD-Pharmingen, San Jose, CA, USA). Lipid peroxide production was determined
211 using C11-BODIPY (581/591) (2 μ M, Thermo Fisher, Waltham, MA). Mitochondrial
212 superoxide levels were measured by MitoSOXTM Red staining (M36008, Thermo
213 Fisher, Waltham, MA). Glutathione was assayed using monochlorobimane (MCB;
214 Thermo Fisher, Waltham, MA).

215 **Western blotting**

216 Cells were washed in Phosphate Buffered Saline (PBS) and lysed in RIPA buffer (20
217 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium
218 deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1mM β -glycerophosphate, 1 mM
219 Na₃VO₄) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Halt Protease and
220 Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific). Cell lysates were separated by
221 SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking 1h in
222 blocking buffer (Tween-PBS 5% bovine serum albumin), membranes were incubated
223 overnight at 4°C with the primary antibodies in blocking buffer (NOTCH1-ICN1). After
224 washes, membranes were incubated for 1h at room temperature with the appropriate
225 secondary antibodies coupled to HRP in blocking buffer. Chemiluminescence signals
226 were revealed using the WestDura Super Signal kit (GE Healthcare Bio-Sciences) on
227 a ChemiDoc XRS from Bio-Rad.

228 **Measurement of synergistic effects**

229 Cell viability was calculated for every dose combination of APR- 246 and
230 topoisomerase inhibitor (doxorubicin or etoposide) using the Synergy Finder webtool
231 (<https://synergyfinder.fimm.fi/>) and compared to each agent alone during 48h.
232 Calculations were based on the ZIP model²⁴.

233 **Statistical analysis**

234 Comparisons for categorical and continuous variables between *TP53^{Mut}* and *TP53^{WT}*
235 subgroups were performed with Fisher's exact test and Mann-Whitney test
236 respectively. Normal distributions were verified before conducting parametric tests.
237 Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis to the last follow-up
238 date censoring living patients. The cumulative incidence of relapse (CIR) was
239 calculated from the complete remission date to the date of relapse censoring patients

240 alive without relapse at the last follow-up date. Relapse and death in complete
241 remission were considered competitive events. Univariate and multivariate analyses
242 assessing the impact of categorical and continuous variables were performed with a
243 Cox model. Proportional-hazards assumption was checked before conducting
244 multivariate analyses. In univariate and multivariate analyses, age and $\log_{10}(\text{WBC})$
245 were considered continuous variables. All analyses were stratified on the trial.
246 Variables with a p-value less than 0.1 in univariate analysis were included in the
247 multivariable models. Statistical analyses were performed with STATA software
248 (STATA 12.0 Corporation, College Station, TX). All p-values were two-sided, with
249 $p < 0.05$ denoting statistical significance. The Circos plot and the Oncoplot were
250 generated using R software.

251 **Study approval**

252 GRAALL0305 and FRALLE2000 trials were conducted in accordance with the
253 Declaration of Helsinki and approved by local and multicenter research ethical
254 committees. The experimental procedures were approved by the Institute Animal Care
255 Committee.

256

257

258

259

260

261 Results

262 Oncogenetic landscape and clinical impact of *TP53* alterations at diagnosis in 263 T-ALL

264 We investigated the clinical characteristics linked to *TP53*^{Alt} in 476 patients, including
265 251 adults enrolled in the GRAALL-2003/2005 trials, and 261 children enrolled in the
266 FRALLE-2000 trial (**Figure S1**). The incidence of *TP53*^{Alt} at diagnosis in these cohorts
267 was 4% (21/476). *TP53*^{Mut} were detected in 9 patients (6 adults and 3 pediatric cases,
268 **Figure 1A** and **Table S1**) and *TP53*^{Del} were identified in 15 patients (7 adult and 8
269 pediatric cases), 3 patients harbored both *TP53*^{Mut} and *TP53*^{Del}. Patients with *TP53*^{Alt}
270 did not significantly differ from *TP53*^{Wt} patients regarding sex, age and central nervous
271 system (CNS) involvement (**Table 1**), but were associated with an immature
272 phenotype (8/20, 40% vs 81/399, 20%, $p = 0.048$). The oncogenetic landscape of
273 *TP53*^{Alt} was comparable to *TP53* wild-type (*TP53*^{Wt}) T-ALLs (**Figure 1B and 1C** and
274 **Figure S2**). To investigate the prognostic value of *TP53*^{Alt}, survival analyses were
275 performed on the series of 476 patients. *TP53*^{Alt} did not confer increased poor
276 prednisone response, defined by a peripheral blood blast count $> 1.0 \times 10^9/L$ at the
277 end of the induction phase) (38% vs 45%, $p = 0.7$) (**Table 1**). Although *TP53*^{Alt} did not
278 significantly influence the morphological complete response rate at the end of the
279 induction course (81% vs 93%, $p = 0.07$), patients harboring *TP53*^{Alt} were associated
280 with delayed early medullary blast clearance, as confirmed by end of induction MRD1
281 assessment, with more positivity ($\geq 10^{-4}$) in *TP53*^{Alt} as compared with *TP53*^{Wt} cases
282 (75% vs 35%, $p = 0.01$). Patients with *TP53*^{Alt} had an inferior outcome compared to
283 *TP53*^{Wt} (**Table 1, Figure 1D**) with an increased cumulative incidence of relapse (CIR)
284 (5y-CIR: 65% vs. 27%; specific hazard ratio (SHR) 3.1, 95%CI (1.67 - 5.78); $p < 0.001$)
285 and a shorter overall survival (OS) (5y-OS: 48% vs. 72%; hazard ratio: 2.34, 95%CI

286 (1.30 - 4.24); $p = 0.005$). In multivariate analysis $TP53^{Alt}$ predicted a statistically lower
287 OS (HR: 2.87, 95%CI (1.56 - 5.26); $p = 0.001$) and higher CIR (SHR, 2.90, 95%CI 1.55
288 - 5.44), $p = 0.001$) even after adjustment on the 4-genes *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN*
289 (*NFRP*) classifier, which identified poor prognosis patients in both GRAALL and
290 FRALLE trials.^{19,25}

291 This study provides the largest comprehensive analysis of $TP53^{Alt}$ in T-ALL, describing
292 for the first time both their clinical profile and, most importantly, the extremely poor
293 prognosis impact associated with $TP53^{Alt}$ at diagnosis in T-ALL, urging the need to
294 develop innovative targeted therapies for patients harboring $TP53^{Alt}$ at diagnosis
295 and/or relapse.

296

297 **T-ALL with $TP53^{Alt}$ are sensitive to APR-246**

298 Negative outcomes observed in T-ALL harboring $TP53^{Alt}$ are likely to be related to p53-
299 induced therapeutic resistance previously described for other malignancies with p53
300 mutations including the loss of wild-type p53 tumor suppressor activity and acquisition
301 of novel functions that disrupt the DNA-damage response pathway and permit tumor
302 survival upon oncogenic stress.^{26,27} APR-246 has recently shown promising results in
303 $TP53^{Mut}$ acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes.²⁸ As $TP53^{Mut}$ are
304 strong drivers of negative outcomes in T-ALL, restoring wild-type function in $TP53$
305 mutated cases could have a beneficial impact. Therefore, we evaluated APR-246
306 sensitivity in $TP53^{Mut}$ T-ALL.

307 We characterized four T-ALL cell lines with previously described missense $TP53^{Mut}$;
308 CEM, RPMI, LOUCY and PEER (p53.iarc.fr and **Table S2** and **Figure S3**). As
309 expected, all 4 T-ALL cell lines $TP53^{Mut}$ were sensitive to APR-246 (**Figure 2A**). In
310 contrast, cell lines proficient for $TP53$ displayed a moderate resistance to the

311 compound. Similar results were obtained from five patient-derived T-ALL $TP53^{Mut}$
312 samples at diagnosis (UPNT1059, UPNT1083 and UPNT1400) or relapse (UPNT1318
313 and UPNT1319) established in our NOD/SCID/huALL patient-derived xenografts
314 (PDX) (**Figure 2B and 2C, Table S3 and Figure S3**), confirming that APR-246 has
315 strong cytotoxic activity in $TP53^{Mut}$ T-ALL. Interestingly, a derived primograft sample
316 (UPNT1318) harboring an acquired- $TP53^{Mut}$ at relapse showed higher sensitivity to
317 APR-246 than the $TP53^{WT}$ diagnosis-matched sample (**Figure 2D**). We confirmed that
318 APR-246 reactivated the p53 pathway and resulted in cell death by promoting
319 apoptosis in $TP53^{Mut}$ T-ALL (**Figures S4A and S4C**).

320 $TP53^{Mut}$ cancer cells are associated with DNA-damage resistance. Hence, we
321 analyzed whether APR-246 could restore the sensitivity to the DNA-damaging agent
322 doxorubicin (a common treatment of T-ALL) *via* the re-conformation of mutant p53 in
323 a wild-type scaffold. As expected, T-cell lines harboring $TP53^{Mut}$ showed relative
324 resistance to doxorubicin. Importantly, the combination therapy of APR-246 and
325 doxorubicin presented a strong synergy in T-ALL cell lines $TP53^{Mut}$ (**Figure 2E and**
326 **2F**). These results suggest that the addition of APR-246 to backbone p53-dependent
327 chemotherapy represents an efficient strategy to target $TP53^{Mut}$ T-ALL and overcome
328 chemoresistance in these patients.

329

330 **Notch1 activation confers subsequent APR-246 sensitivity in T-ALL $TP53^{WT}$**

331 To evaluate the sensitivity of T-ALL to APR-246 in absence of $TP53^{Alt}$, we screened a
332 large series of $TP53^{WT}$ T-ALL samples. Surprisingly, we found that certain $TP53^{WT}$ T-
333 ALL presented a net and unexpected sensitivity to APR-246 (**Figure 3A**). To identify
334 oncogenic features associated with APR-246 response, we analyzed their genetic
335 landscape (**Figure 3B**). This led us to identify that the vast majority of APR-246

336 responsive PDX harbored *NOTCH1* alterations. Indeed, 11/12 (92%) *NOTCH1*-
337 mutated T-ALL were associated with a high sensitivity to APR-246 (IC₅₀ < 5 μM) while
338 5/6 (83%) *NOTCH1* wild-type cases were resistant (p<0.01) (**Figure 3C**).

339

340 To functionally demonstrate the relationship between Notch1 activation and APR-246
341 sensitivity, we first co-cultured the Loucy T-ALL cell line (*TP53^{Mut} NOTCH1^{WT}*) on OP9-
342 DL1, to activate the Notch1 pathway via Notch1 Delta-like ligand 1 (DL-1) interaction.
343 This co-culture led to robust Notch1 pathway activation in Loucy T-ALL cell line, as
344 confirmed by both the increase of Notch1-ICN1 protein expression and the
345 upregulation of Notch1 target genes (**Figure S5A**).

346 Additionally, we developed a model of oncogenic Notch1 activation in a wild-type
347 xenograft of primary T-ALL sample. We introduced a *NOTCH1-PEST* mutation by
348 CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *TP53^{WT}NOTCH1^{WT}* T-ALL PDX (UPNT-525)
349 (**Figure 3D**). As expected, this introduction of a *NOTCH1-PEST* mutation increases
350 Notch1-ICN1 protein levels and subsequent Notch1 pathway target gene expression
351 (mRNA HES1 and HEY1) (**Figure 3E**). Critically, the sole oncogenic activation of
352 Notch1 efficiently sensitizes to APR-246 in the range of our results established on
353 genuine *TP53^{WT}NOTCH1^{ALT}* T-ALL (**Figure 3F**). In addition, the Loucy cell line
354 exhibited higher sensitivity to APR-246 when co-cultured on OP9-DL1, reinforcing the
355 interplay between Notch1 signaling and AP-246 efficacy (**Figure S5D**). Altogether, our
356 data strongly suggest that the oncogenic activation of Notch1 confers sensitivity to
357 APR-246.

358

359

360

361 **NOTCH1 mutations induced ferroptosis and APR-246 response.**

362 We further sought to address the mode of action of APR-246 in *TP53^{WT}* T-ALL and
363 the mechanisms by which *NOTCH1^{Mut}* sensitizes to APR-246. Since APR-246 exerts
364 a p53-independent function *via* the depletion of glutathione (GSH) and the
365 accumulation of mitochondrial ROS, leading to the induction of ferroptosis, we
366 examined whether the anti-leukemic activity of APR-246 was mediated by ferroptosis
367 in T-ALL. This alternative cell death mechanism is characterized by elevated
368 mitochondrial ROS production and a failure of the oxidative stress response mediated
369 by the GSH redox system, leading to the accumulation of toxic peroxidized lipids.

370 As expected, Notch1-driven T-ALL present marked reliance on the glutathione redox
371 pathway and addiction to ROS scavenging to cope with intensified oxidative stress,
372 reinforcing their priming for ferroptosis. Notch1 has been described to be responsible
373 for glutathione synthetase downregulation.²⁹ Decreased GSH levels also act as a
374 primer for ferroptosis induction.

375

376 T-ALL harboring *NOTCH1^{Mut}* contained higher levels of mitochondrial ROS (mtROS),
377 peroxidized lipids, and reduced total glutathione levels than in *NOTCH1^{WT}* T-ALL,
378 highlighting that oncogenic NOTCH1 activation could sensitize T-ALL to APR-246
379 through ferroptosis induction (**Figure 4A**). *Ex vivo* APR-246 treatment induced an
380 increase in mitochondrial ROS, marked depletion in reduced glutathione levels (GSH),
381 and an accumulation of peroxidized lipids in *TP53^{WT} NOTCH1^{WT/Mut}* (**Figure 4B**) and
382 in *TP53^{Mut}* T-ALL (**Figure S6**), reinforcing the concept that APR-246 induces
383 ferroptosis irrespective of *TP53* mutational status. Metabolomics analyses revealed
384 that *NOTCH1^{Mut}* T-ALL had lower levels of reduced (GSH) and oxidized (GSSG)
385 glutathione, a major scavenger of mtROS, resulting in a diminished GSG:GSSG ratio,

386 a hallmark of elevated oxidative stress (**Figure 4C**). Etoposide is a commonly used
387 chemotherapeutic drug in ALL that inhibits topoisomerase 2 activity (and induces
388 apoptosis in a p53-dependant manner). Interestingly, the combination therapy of APR-
389 246 and etoposide presented a strong synergy in T-ALL cell lines $TP53^{WT}$ (**Figure 4D**).
390 Recent studies suggested that etoposide could regulate the RedOX system by
391 inducing ROS generation and GSH depletion^{30,31}, contributing to explain the strong
392 synergy of the combination of etoposide and APR-246 in T-ALL through ferroptosis
393 induction. Hence, Notch1 pathway activation, *via* the induction of ferroptosis, could
394 enhance APR-246 sensitivity of $TP53^{WT}$ $NOTCH1^{Mut}$ T-ALL. Finally, we evaluated the
395 levels of ferroptosis markers in our models of inducible Notch1 pathway. Critically,
396 Notch1 activation enhanced lipid peroxidation and GSH depletion, indicative of an
397 unresolved oxidative stress (**Figure 4E** and **Figure S5B** and **S5C**) after APR-246
398 exposition. Overall, these results strongly suggest that activation of Notch1 signaling
399 regulate APR-246 sensitivity by conferring a vulnerability to ferroptosis.

400

401

402

403

404

405

406 Discussion

407 During the past decade, the outcome of pediatric and adult T-ALL has globally
408 improved with modern poly-chemotherapy, yet T-ALL remains of poor prognosis,
409 notably for relapsing cases, when secondary chemoresistance is common. About 25%
410 pediatric and 50% adult T-ALL patients relapse, with a 5-year survival inferior to 20%
411 in both age groups.^{1,2} The sole therapeutic approaches with a curative potential for T-
412 ALL relapsed cases are limited to conventional chemotherapy or hematopoietic stem
413 cell transplantation (HSCT). Immunotherapeutic targeted therapies have shown major
414 efficacies in patients with relapsed B-ALL (e.g., blinatumomab; a bispecific T-cell
415 engager CD3-CD19, inotuzumab; an anti-CD22 conjugated antibody, chimeric antigen
416 receptor (CAR)-modified T cells)) leading to their evaluation in recent front-line trials
417 in B-ALL. Extrapolating these successes to T-ALL remains limited, notably due to
418 shared common surface antigens between CAR-T cells, normal and tumoral T-lineage
419 cells. Molecular genetic analyses and sequencing studies have recently led to the
420 identification of recurrent T-ALL alterations associated with the prognostic, allowing to
421 refine the stratification of the relapse risk (e.g., the *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN*
422 classifier, *DNMT3A*, *IKZF1* and *IDH2* alterations).^{19,32-34} Yet, a significant proportion
423 of T-ALL relapses remain unpredicted, underlining the urge for new predictive
424 markers. As in many cancers, *TP53* alterations convey a poor prognosis in T-ALL.
425 Importantly, T-ALL harboring *TP53^{Mut}* are sensitive to APR-246, justifying their
426 identification at diagnosis or at relapse to benefit from therapeutic intensification and
427 new targeted therapeutic approaches such as APR-246. Beyond T-ALL *TP53^{Mut}*, T-
428 ALL with Notch1 activation, an oncogenic lesion observed in the majority of T-ALL
429 (nearly 70%), also exhibited sensitivity to APR-246, paving the way for promising
430 perspectives in T-ALL treatment strategy. Our data would plead for front-line

431 evaluation of APR-246 for patients with *TP53^{Mut}* and in relapsed patients harboring
432 mutations of the Notch1 pathway.

433 It has been previously demonstrated that several oncogenic pathways render cancer
434 cells extremely susceptible to ferroptosis-induced cell death through the modulation of
435 key regulatory ferroptosis checkpoints. Here, we demonstrate that Notch1 activation
436 induces a favorable context for ferroptosis-mediated cell death. Hence, we propose
437 Notch1 signaling activity as a read-out for ferroptosis and the associated APR-246
438 sensitivity. The deregulation of the Notch1 pathway is central in the development of T-
439 ALL and provides a genetic background that, as previously demonstrated, is a robust
440 driver of the aggressive nature of T-ALL. We propose that Notch1 activation conveys
441 a favorable environment marked by unresolved elevated oxidative stress that leverage
442 APR-246 efficacy. Importantly, this Notch1-induced susceptibility that favors APR 246
443 sensitivity could explain the resistance to APR-246 observed in B-ALL *TP53^{Wt}* in
444 opposition to B-ALL *TP53^{Mut}* which exhibits high sensitivity to APR-246³⁵. Additionally,
445 our study reinforces the concept that APR-246 may convey anti-cancer properties
446 beyond its TP53-dependant functions.^{17,18}

447

448 Recent studies shed light on the complex interplay between Notch1 and p53 signaling
449 pathways. Critically, Notch1 acts as a repressor of p53 function through diverse
450 mechanisms including a direct protein-protein interaction between the N-terminal
451 domain of Notch1 and p53 resulting in the inhibition of p53 phosphorylation and DNA
452 binding activity. This crosstalk between Notch1 and p53 may constitute a critical driver
453 for leukemia onset and progression. Hence, one can hypothesize that APR-246
454 restores p53 function and exerts anti-leukemic activity in Notch1-altered *TP53^{WT}* T-
455 ALL, explaining the higher sensitivity to APR-246 of *NOTCH1^{Mut}* T-ALL. Critically,

456 exposure to APR-246 does not activate the p53 pathway in a *TP53^{WT}* context (**Figures**
457 **S4B** and **S4D**). Thus, sensitization to APR-246 in a *TP53^{WT}* context does not appear
458 to involve the reactivation of a functional p53 pathway.

459

460 Beyond T-ALL, *NOTCH1* gain-of-function mutations have been identified in a large
461 scope of hematological malignancies (e.g. 15% of chronic lymphocytic leukemia/small
462 lymphocytic lymphoma, 10% of mantle cell lymphoma, 15% of Adult T-cell
463 leukemia/lymphoma, 11% of splenic diffuse red pulp small B cell lymphoma) and in
464 different solid cancers, including breast, medulloblastoma, colorectal cancer,
465 melanoma.³⁶⁻³⁸ Oncogenic activation of Notch1 has been associated with disease
466 initiation and progression, and implicated in the resistance to chemotherapy.^{37,38}
467 Hence, our results shed light on Notch1-driven vulnerabilities that can be exploited by
468 targeted therapies such as APR-246 and provide a rationale for its clinical use beyond
469 the scope of leukemia.

470

471 **Acknowledgements**

472 The authors thank all the participants of the GRAALL-2003 and GRAALL-2005 study
473 groups, the SFCE and the investigators of the 16 SFCE centers involved in collection
474 and provision of data and patient samples, and V. Lheritier for collection of clinical
475 data. This work was supported by grants to Necker laboratory from the CAncer
476 Research for PErsonalized Medicine (CARPEM), Association pour la Recherche
477 contre le Cancer (Equipe labellisée), Institut National du Cancer PRT-K 18-071,
478 Fédération Leucémie Espoir and Horizon Hémato. The GRAALL was supported by
479 grants P0200701 and P030425/AOM03081 from the Programme Hospitalier de
480 Recherche Clinique, Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, France and the Swiss

481 Federal Government in Switzerland. Samples were collected and processed by the
482 AP-HP "Direction de Recherche Clinique" Tumor Bank at Necker-Enfants Malades. M.
483 Simonin was supported by « Action Leucémie », "Ligue contre le Cancer" et « Soutien
484 pour la formation à la recherche translationnelle en cancérologie - Plan cancer 2009-
485 2013 ». G. P. Andrieu was supported by the Fondation de France (FDF).

486

487 **Authorship Contributions**

488 V.A, O.H, M.S and G.P.A conceived and designed the research and oversaw the project;
489 M.B, C.G, N.G, J-M.C, F.H, Y.C, Y.B, E.M, V.G, A.P, P.R, A.B, D.B, O.H, N.B, V.A provided
490 study materials or patients; M.S, G.P.A and V.A performed molecular analyses; M.S and
491 G.P.A collected and assembled data; N.B and M.S performed statistical analysis; M.S,
492 G.P.A, R.B, O.H V.A, N.B analyzed and interpreted data; M.S, G.P.A, N.B and V.A wrote the
493 manuscript. M.S and G.P.A contributed equally to this work.

494

495 **Disclosure of Conflicts of Interest**

496 The authors declare no competing financial interests.

497

498

499

500 **References**

- 501 1. Desjonquères A, Chevallier P, Thomas X, et al. Acute lymphoblastic leukemia
502 relapsing after first-line pediatric-inspired therapy: a retrospective GRAALL study. *Blood*
503 *Cancer J.* 2016;6(12):e504.
- 504 2. Bhojwani D, Pui C-H. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*
505 *Oncol.* 2013;14(6):e205-217.
- 506 3. Levine AJ. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nature*
507 *Reviews Cancer.* 2020;20(8):471–480.
- 508 4. Kawamura M, Ohnishi H, Guo SX, et al. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and
509 RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 1999;23(2):115–
510 126.
- 511 5. Van Vlierberghe P, Ambesi-Impiombato A, De Keersmaecker K, et al. Prognostic
512 relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.*
513 2013;122(1):74–82.
- 514 6. Stengel A, Schnittger S, Weissmann S, et al. TP53 mutations occur in 15.7% of ALL
515 and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy, and a poor prognosis.
516 *Blood.* 2014;124(2):251–258.
- 517 7. Richter-Pechańska P, Kunz JB, Hof J, et al. Identification of a genetically defined
518 ultra-high-risk group in relapsed pediatric T-lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Journal.*
519 2017;7(2):e523.
- 520 8. Hof J, Kox C, Groeneveld-Krentz S, et al. NOTCH1 mutation, TP53 alteration and
521 myeloid antigen expression predict outcome heterogeneity in children with first relapse of T-
522 cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2017;102(7):e249–e252.
- 523 9. Diccianni MB, Yu J, Hsiao M, et al. Clinical significance of p53 mutations in relapsed
524 T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1994;84(9):3105–3112.
- 525 10. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T
526 cell acute lymphoblastic leukemia. *Science.* 2004;306(5694):269–271.
- 527 11. Dotto GP. Crosstalk of Notch with p53 and p63 in cancer growth control. *Nat Rev*
528 *Cancer.* 2009;9(8):587–595.
- 529 12. Kim SB, Chae GW, Lee J, et al. Activated Notch1 interacts with p53 to inhibit its
530 phosphorylation and transactivation. *Cell Death & Differentiation.* 2007;14(5):982–991.
- 531 13. Genescà E, Lazarenkov A, Morgades M, et al. Frequency and clinical impact of
532 CDKN2A/ARF/CDKN2B gene deletions as assessed by in-depth genetic analyses in adult T
533 cell acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol.* 2018;11:.
- 534 14. Beverly LJ, Felsher DW, Capobianco AJ. Suppression of p53 by Notch in
535 lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Res.* 2005;65(16):7159–
536 7168.
- 537 15. Lambert JMR, Gorzov P, Veprintsev DB, et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by
538 covalent binding to the core domain. *Cancer Cell.* 2009;15(5):376–388.
- 539 16. Bykov VJN, Issaeva N, Shilov A, et al. Restoration of the tumor suppressor function
540 to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med.* 2002;8(3):282–288.
- 541 17. Liu DS, Duong CP, Haupt S, et al. Inhibiting the system xC-/glutathione axis
542 selectively targets cancers with mutant-p53 accumulation. *Nat Commun.* 2017;8:14844.
- 543 18. Birsén R, Larrue C, Decroocq J, et al. APR-246 induces early cell death by
544 ferroptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2021;
- 545 19. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, et al. Toward a

- 546 NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute
 547 lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia
 548 study. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(34):4333–4342.
- 549 20. Bond J, Marchand T, Touzart A, et al. An early thymic precursor phenotype predicts
 550 outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a
 551 Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *Haematologica.*
 552 2016;101(6):732–740.
- 553 21. Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, et al. Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-
 554 acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage
 555 commitment. *Blood.* 2003;101(7):2693–2703.
- 556 22. Yoon S, Xuan Z, Makarov V, Ye K, Sebat J. Sensitive and accurate detection of copy
 557 number variants using read depth of coverage. *Genome Res.* 2009;19(9):1586–1592.
- 558 23. Trinquand A, Dos Santos NR, Tran Quang C, et al. Triggering the TCR
 559 Developmental Checkpoint Activates a Therapeutically Targetable Tumor Suppressive
 560 Pathway in T-cell Leukemia. *Cancer Discov.* 2016;6(9):972–985.
- 561 24. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug
 562 combination synergies. *Nucleic Acids Research.* 2020;48(W1):W488–W493.
- 563 25. Petit A, Trinquand A, Chevret S, et al. Oncogenetic mutations combined with MRD
 564 improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.*
 565 2018;131(3):289–300.
- 566 26. Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug
 567 resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget.* 2016;8(5):8921–8946.
- 568 27. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell*
 569 *Death & Differentiation.* 2019;26(2):199–212.
- 570 28. Cluzeau T, Sebert M, Rahmé R, et al. Eprenetapopt Plus Azacitidine in TP53-
 571 Mutated Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia: A Phase II Study by the
 572 Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM). *J Clin Oncol.* 2021;JCO2002342.
- 573 29. Nguyen TL, Nokin M-J, Terés S, et al. Downregulation of Glutamine Synthetase, not
 574 glutaminolysis, is responsible for glutamine addiction in Notch1-driven acute lymphoblastic
 575 leukemia. *Mol Oncol.* 2021;15(5):1412–1431.
- 576 30. Shin H-J, Kwon H-K, Lee J-H, Anwar MA, Choi S. Etoposide induced cytotoxicity
 577 mediated by ROS and ERK in human kidney proximal tubule cells. *Sci Rep.*
 578 2016;6(1):34064.
- 579 31. Monteleone L, Speciale A, Valenti GE, et al. PKC α Inhibition as a Strategy to
 580 Sensitize Neuroblastoma Stem Cells to Etoposide by Stimulating Ferroptosis. *Antioxidants*
 581 *(Basel).* 2021;10(5):691.
- 582 32. Bond J, Touzart A, Leprêtre S, et al. DNMT3A mutation is associated with increased
 583 age and adverse outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.*
 584 2019;104(8):1617–1625.
- 585 33. Simonin M, Lhermitte L, Dourthe M-E, et al. IKZF1 alterations predict poor prognosis
 586 in adult and pediatric T-ALL. *Blood.* 2020;
- 587 34. Simonin M, Schmidt A, Bontoux C, et al. Oncogenetic landscape and clinical impact
 588 of IDH1 and IDH2 mutations in T-ALL. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):74.
- 589 35. Demir S, Boldrin E, Sun Q, et al. Therapeutic targeting of mutant p53 in pediatric
 590 acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2020;105(1):170–181.
- 591 36. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. The Varied Roles of Notch in Cancer. *Annu Rev*
 592 *Pathol.* 2017;12:245–275.
- 593 37. Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a

594 little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(5):338–351.
595 38. Roy M, Pear WS, Aster JC. The multifaceted role of Notch in cancer. *Curr Opin*
596 *Genet Dev*. 2007;17(1):52–59.
597
598
599
600
601
602

603 **Table Legends**

604 **Table 1: Clinico-biological and outcome characteristics of adult and pediatric T-**
605 **ALL (GRAALL and FRALLE protocols) according to *TP53* status.**

606 Abbreviations: T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood count;
607 CNS, central nervous system; ETP, early thymic precursor; *High Risk* classifier,
608 *NOTCH1/FBXW7-RAS/PTEN* classifier as previously described^{19,25}; CR, complete
609 remission; MRD, minimal residual disease; Allo-HSCT, allogenic hematopoietic stem
610 cell transplantation; CIR, cumulative incidence of relapse; OS, overall survival; HR:
611 hazard ratio, SHR: specific hazard ratio, CI: confidence interval.

612 MRD1 correspond to MRD evaluation after induction and was performed by allele-
613 specific oligonucleotides polymerase chain reaction. T-cell receptor status and
614 oncogenic were performed as described in supplemental methods.

615

616 **Table 1.** Clinico-biological and outcome characteristics of adult and pediatric T-ALL
 617 (GRAALL and FRALLE protocols) according to *TP53* status

Variable	<i>TP53^{Alt}</i> n = 21 (4%)	<i>TP53^{WT}</i> n = 455 (96%)	Total n = 476	p-value ²
Male	14 / 21 (67%)	343 / 455 (75%)	357 / 476 (75%)	0.4
Age (y) ¹	23.4 (4.0-51.8)	15.3 (1.1-59.1)	15.3 (1.1-59.1)	0.5
WBC (G/l) ¹	25 (5-674)	66 (0-980)	64 (0-980)	0.01
CNS Involvement	3 / 21 (14%)	48 / 453 (11%)	51 / 474 (11%)	0.5
Immunophenotype				
ETP phenotype	6 / 16 (38%)	50 / 291 (17%)	56 / 307 (18%)	0.09
Immature (IM0/δ/γ)	8 / 20 (40%)	81 / 399 (20%)	89 / 419 (21%)	0.048
αβ lineage	6 / 20 (30%)	205 / 399 (51%)	211 / 419 (50%)	0.07
Mature TCRγδ	3 / 20 (15%)	63 / 399 (16%)	66 / 419 (16%)	>0.9
Oncogenetic classification				
<i>TLX1</i>	1 / 18 (6%)	53 / 397 (13%)	54 / 415 (13%)	0.5
<i>TLX3</i>	2 / 18 (11%)	70 / 397 (18%)	72 / 415 (17%)	0.8
<i>SIL-TAL1</i>	1 / 18 (6%)	56 / 397 (14%)	57 / 415 (14%)	0.5
<i>CALM-AF10</i>	0 / 18 (0%)	13 / 397 (3%)	13 / 415 (3%)	>0.9
High-Risk Classifier	13 / 21 (62%)	196 / 455 (43%)	209 / 476 (44%)	0.12
Treatment Response				
Prednisone response	13 / 21 (62%)	246 / 446 (55%)	259 / 467 (55%)	0.7
Chemosensitivity	12 / 21 (57%)	325 / 446 (73%)	337 / 467 (72%)	0.1
MRD1 > 10 ⁻⁴	9 / 12 (75%)	114 / 328 (35%)	123 / 340 (36%)	0.01
Complete Remission	17 / 21 (81%)	423 / 455 (93%)	440 / 476 (92%)	0.07
Allo-HSCT	4/20 (20%)	97 / 436 (22%)	101 / 456 (22%)	0.7
Outcome				
5-year CIR [95% CI]	65% [11;43]	27% [23;32]	29% [25;33]	<0.001
5-year OS [95% CI]	48% [26;67]	72% [68;76]	71% [67;75]	0.005

Univariate and Multivariate Analysis³						
CIR	Univariate			Multivariate		
	SHR	95%CI	p	SHR	95%CI	p
Age	1.01	(0.98 ; 1.03)	0.57	-	-	-
CNS	1.57	(0.85 ; 2.59)	0.08	1.28	(0.77 ; 2.13)	0.34
Log(WBC)	1.62	(1.2 ; 2.18)	0.002	1.62	(1.19 ; 2.19)	0.002
Prednisone response	0.67	(0.47 ; 0.95)	0.03	0.93	(0.64 ; 1.35)	0.70
High-risk Classifier	2.78	(1.94 ; 3.99)	< 0.001	2.58	(1.73 ; 3.74)	< 0.001
<i>TP53^{Alt}</i>	3.11	(1.67 ; 5.78)	< 0.001	2.90	(1.55 ; 5.44)	0.001
OS	HR	95%CI	p	HR	95%CI	p
	Age	1.03	(1.01 ; 1.05)	0.001	1.05	(1.03 ; 1.07)
CNS	2.00	(1.28 ; 3.14)	0.002	1.64	(1.02 ; 2.64)	0.04
Log(WBC)	1.99	(1.48 ; 2.67)	< 0.001	2.01	(1.51 ; 2.86)	< 0.001
Prednisone response	0.54	(0.38 ; 0.76)	< 0.001	0.83	(0.57 ; 1.20)	0.31
High-risk Classifier	2.93	(2.06 ; 4.17)	< 0.001	2.90	(2.01 ; 4.18)	< 0.001
<i>TP53^{Alt}</i>	2.34	(1.30 ; 4.24)	0.005	2.87	(1.55 ; 5.26)	0.001

¹Statistics presented: Median (Minimum-Maximum)

²Statistical tests performed: Fisher's exact test; Wilcoxon rank-sum test.

³Univariate and multivariate Cox analyses stratified on protocol

p-values < 0.05 are indicated in bold

620 **Figure Legends**

621 **Figure 1: *TP53* Alterations in the GRAALL03/05 and FRALLE2000 studies**

- 622 A. Lollipop plots indicating the observed *TP53* mutations in 476 T-ALL patients.
- 623 B. Circos plots depicting the co-occurring alterations in T-ALL *TP53Alt*.
- 624 C. Oncoplot depicting the genetic anomalies observed in *TP53* Altered or Wild-type T-
- 625 ALL cases of the GRAALL03/05 and FRALLE2000 studies. Genes are classified by
- 626 functional groups. The right panel indicates the overall frequency of alterations per
- 627 gene.
- 628 D. Clinical impact of *TP53* Alterations in the GRAALL0305 and FRALLE2000 studies.
- 629 Overall survival (left panel) and cumulative incidence of relapse (right panel). The red
- 630 curve represents the *TP53Alt* T-ALL, and the black curve the *TP53WT* patients

631

632 **Figure 2: APR-246 is effective in T-ALL with *TP53Mut* and restores sensitivity to**
 633 **doxorubicin**

- 634 A. APR-246 induces cell death in *TP53^{Mut}* T-ALL cell lines (Loucy, CEM, PEER and
- 635 RPMI) and shows moderate cytotoxicity in *TP53^{Wt}* T-ALL cell lines (ALL-SIL,
- 636 MOLT4)
- 637 B. APR-246 induces cell death in T-ALL *TP53^{Mut}* PDX (5 T-ALL samples)
- 638 C. APR-246 in T-ALL *TP53^{Mut}*
- 639 D. Acquisition of *TP53^{Mut}* at relapse increases sensitivity to APR-246 in T-ALL
- 640 E. APR-246 restores doxorubicin sensitivity in *TP53^{Mut}* T-cell lines Loucy and PEER
- 641 F. Synergistic effects of APR-246 and doxorubicin in *TP53^{Mut}* T-ALL cell lines Loucy
- 642 and PEER

643

644 **Figure 3: T-ALL are sensitive to APR-246 in absence of *TP53* alterations and**
645 **Notch1 activation confers vulnerability to APR-246**

- 646 A. T-ALL PDX *TP53*^{WT} are sensitive to APR-246 in absence of *TP53* alterations
647 B. Oncoplot recapitulating the oncogenetic landscape of 18 T-ALL PDX *TP53*^{WT}
648 treated with APR-246.
649 C. T-ALL PDX *TP53*^{WT} *NOTCH1*^{Mut} are associated with higher sensitivity to APR-246
650 than *TP53*^{WT} *NOTCH1*^{WT}
651 D. We introduce a frameshift mutation affecting the *NOTCH1-PEST* domain in a T-
652 ALL PDX *TP53*^{WT} *NOTCH1*^{WT} (UPNT525) using CRISPR-cas9 system
653 E. CRISPR/Cas9-induced *NOTCH1-PEST* truncation leads to ICN1 accumulation in
654 T-ALL PDX *TP53*^{WT} *NOTCH1*^{WT} (right panel). Expression of Notch1 target genes
655 (HES1 and HEY1) was elevated in CRISPR/Cas9-induced *NOTCH1-PEST* T-ALL
656 PDX (left panel)
657 F. CRISPR/Cas9-induced *NOTCH1-PEST* truncation is associated with a higher
658 sensitivity to APR-246.

659

660 **Figure 4: Notch1 activation conveys sensitivity to APR-246 by priming for**
661 **ferroptosis.**

- 662 A-B. Quantitation of GSH, peroxidized lipids and mitochondrial ROS by flow cytometry
663 in *NOTCH1*^{Mut} vs *NOTCH1*^{WT} T-ALL PDX.
664 C. Quantitation of GSH and GSSG by metabolomics in *NOTCH1*^{Mut} vs *NOTCH1*^{WT} T-
665 ALL PDX.
666 D. Synergistic effects of APR-246 and etoposide in *TP53*^{WT} *NOTCH1*^{Mut} and *TP53*^{WT}
667 *NOTCH1*^{WT} T-ALL PDX
668 E. CRISPR/Cas9-induced *NOTCH1-PEST* truncation is associated with increased

Figure 1

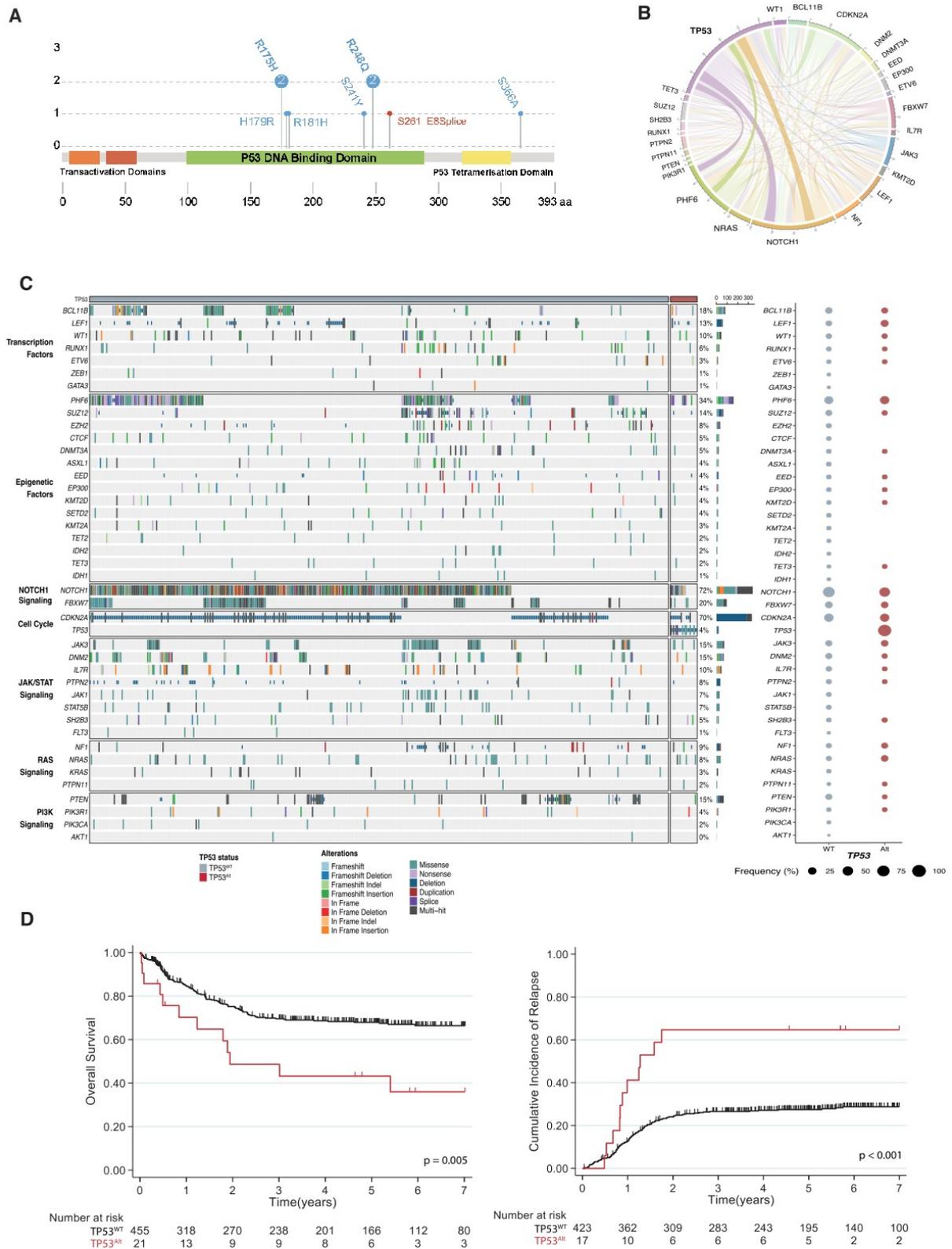


Figure 2

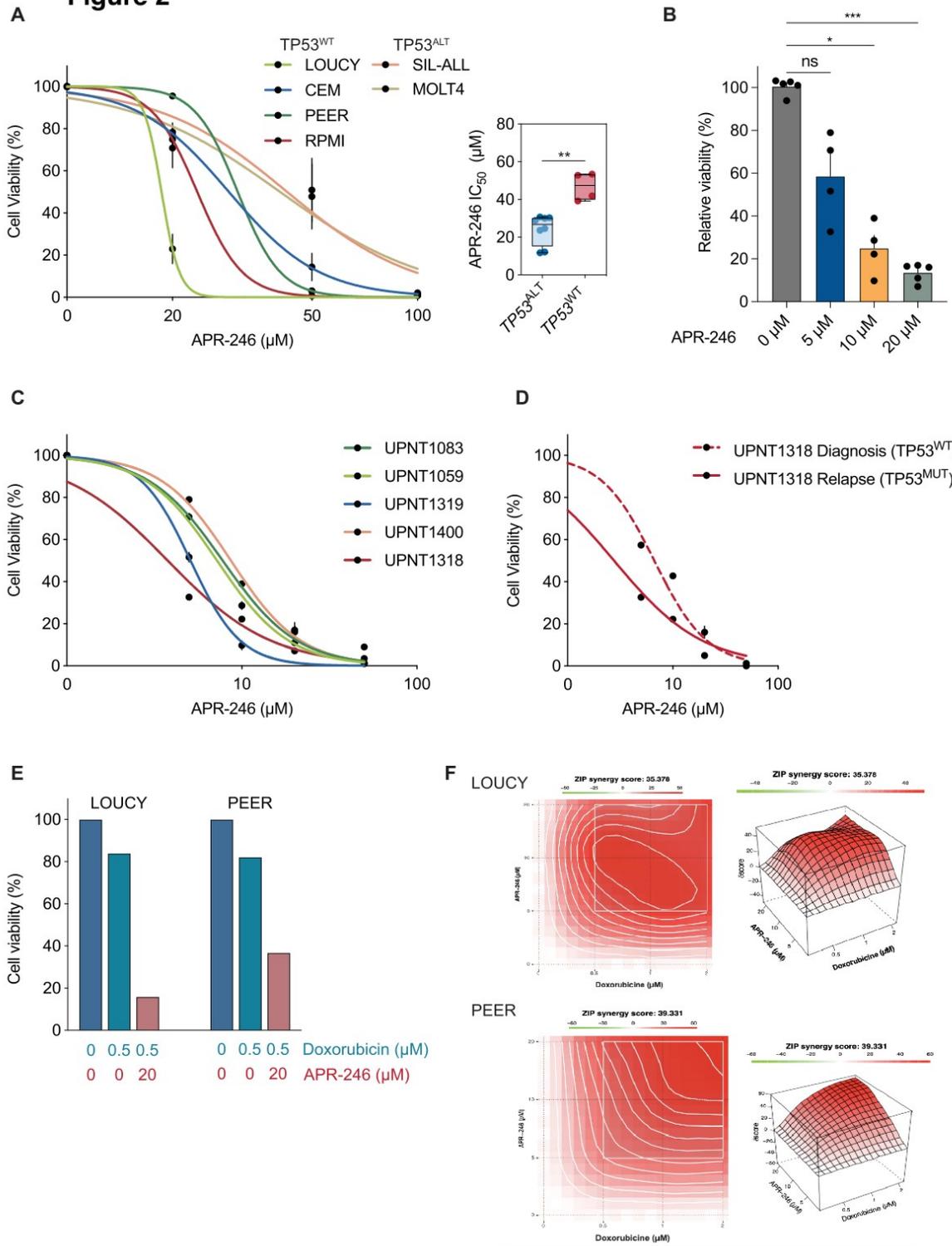


Figure 3

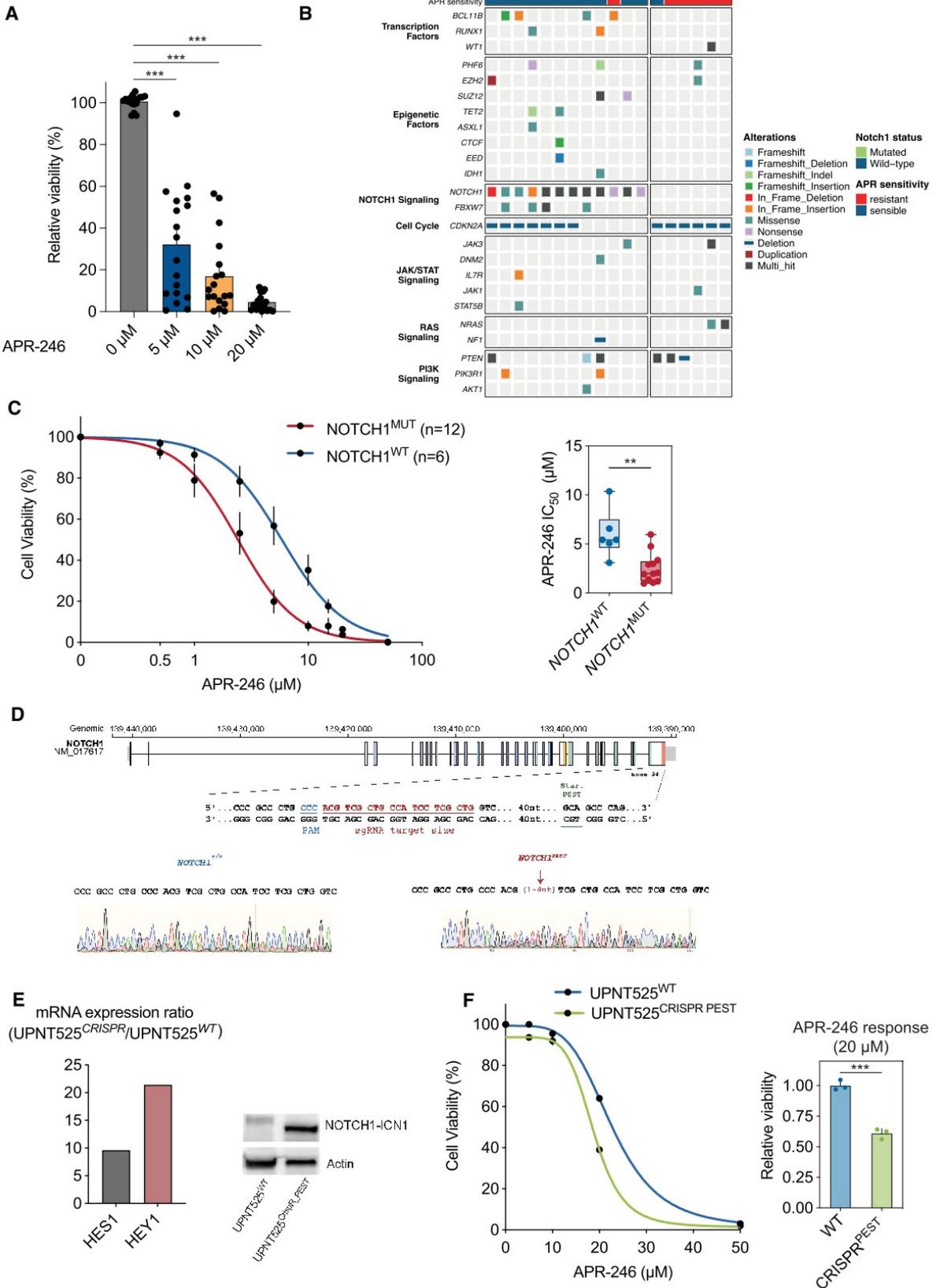
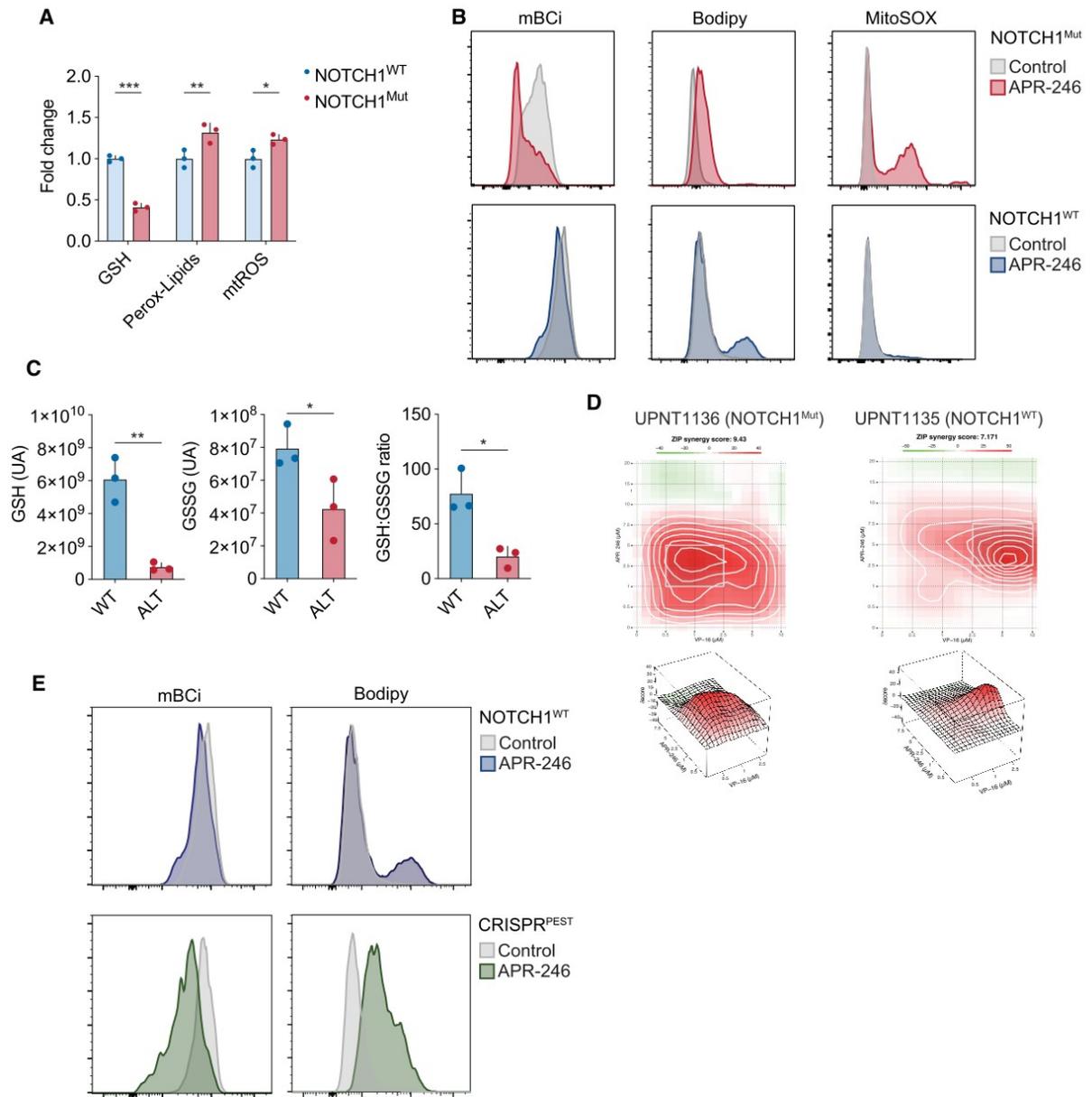


Figure 4



Supplementary data

TP53 and NOTCH1 alterations induce vulnerability to APR-246 in T-ALL

Mathieu Simonin^{*1,2,3}, Guillaume P. Andrieu^{*1,2}, Rudy Birsén⁴, Marie Balsat⁵, Guillaume Hypolite^{1,2}, Lucien Courtois^{1,2}, Carlos Graux⁶, Nathalie Grardel⁷, Jean-Michel Cayuela⁸, Françoise Huguet⁹, Yves Chalandon^{10,11}, Yannick Le Bris¹², Elizabeth Macintyre^{1,3}, Virginie Gandemer¹³, Arnaud Petit³, Philippe Rousselot¹⁴, André Baruchel¹⁵, Didier Bouscary⁴, Olivier Hermine¹⁶, Nicolas Boissel¹⁷, Vahid Asnafi^{1,2§}

Affiliations

¹ Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker Enfants-Malades, Université de Paris, Paris, France

² Institut Necker-Enfants Malades (INEM), Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) U1151

³ Department of Pediatric Hematology and Oncology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Armand Trousseau Hospital, Sorbonne Université, Paris, France

⁴ Université de Paris, Institut Cochin, CNRS UMR8104, INSERM U1016, Paris, France, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Centre-Université de Paris, Service d'Hématologie clinique, Hôpital Cochin

⁵ Hospices Civils de Lyon, Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France

⁶ CHU UCL Namur – Godinne, service d'Hématologie, Yvoir, Belgique

⁷ Laboratory of Hematology, CHRU Lille, Lille, France and U1172, INSERM, LILLE, France

⁸ Hematology Laboratory and EA3518, University Hospital Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France

⁹ Department of Hematology, CHRU - Institut Universitaire de Cancer Toulouse - Oncopole, Toulouse, France

¹⁰ Division of Hematology, Department of Oncology, University Hospital of Geneva and Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland

¹¹ Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK), Bern, Switzerland

¹² Hematology Biology, Nantes University Hospital & CRCINA, Nantes, France

¹³ Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital of Rennes, France

¹⁴ Hemato-Oncology Unit, Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay, France ; Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, UMR1184 Université Paris-Saclay, Communauté Paris-Saclay, France

¹⁵ Department of Pediatric Hematology and Immunology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Robert Debré Hospital, University Paris Diderot, Paris, France

¹⁶ Department of Hematology, Inserm U1163, IMAGINE Institute, Paris University, Necker Hospital, Paris, France

¹⁷ Université Paris Diderot, Institut Universitaire d'Hématologie, EA-3518, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, University Hospital Saint-Louis, Paris, France.

*co-first authors

§Corresponding author

Supplementary Tables

TP53 and NOTCH1 alterations induce vulnerability to APR-246 in T-ALL

Table S1

TP53 mutations identified among the 476 screened patients with T-ALL (FRALLE2000 and GRAALL0305 protocols)

Mutation	Genomic	Exon	Codon	VAF	Del 17p
p.R175H	17:7578406	5	CGC/CAC	43%	no
p.R175H	17:7578406	5	CGC/CAC	67%	no
p.H179R	17:7578394	5	CAT/CGT	27%	no
p.R181H	17:7578388	5	CGC/CAC	8%	no
p.S241Y	17:7577559	7	TCC/TAC	91%	yes
p.R248Q	17:7577538	7	CGG/CAG	75%	yes
p.R248W	17:7577539	7	CGG/TGG	45%	yes
Splice Region	17:7577162	-7_ex8	T/C	57%	no
p.S366A	17:7573931	10	TCC/GCC	55%	no

Table S2

TP53 and *NOTCH1* mutations identified in T-ALL cell lines

T-cell lines	<i>TP53</i> status	<i>NOTCH1</i> status
<i>T-cell lines TP53^{WT}</i>		
MOLT-4	-	p.P2515fs*4
SIL-ALL	-	p.fs2473
<i>T-cell lines TP53^{MUT}</i>		
PEER	p.Y163C	p.L1600P (HD)
RPMI	p.R273C	p.InsPW1584 (HD)
CEM	p.R175H + p.R248Q	p.insTP1586 (HD)
Loucy	p.V272M	-

Table S3

TP53 and *NOTCH1* mutations identified in T-ALL PDX

UPNT	<i>TP53</i> status	<i>NOTCH1</i> status
<i>PDX T-ALL TP53^{MUT}</i>		
1318	p.R248Q	-
1059	p.I254T	-
1319	p.H214R	p.L1600Q (HD)
1400	p.R248Q	p.R1598P (HD)
1083	c.919+1G>T (splicing)	p.T1602N (HD) / p.PH2510fs (PEST)
<i>PDX T-ALL TP53^{WT}</i>		
<i>NOTCH1^{MUT}</i>		
615	-	p.L1678P (HD)
698	-	p.InsL1617 (HD)
1137	-	p.L1593_R1594insPL (HD) / p.IL2466fs (PEST)
1135	-	p.L1678P (HD) / p.Q2404* (PEST)
474	-	p.F1592S (HD)
1005	-	p.DelV1578 (HD)
894	-	p.S2467* (PEST)
486	-	p. L1585Q (HD)

		/ p.R1598P (H)
565	-	p.L1678P (HD) / InsDA2437fs (PEST)
1320	-	p.L1600P (HD) / p.P2462fs (PEST)
414	-	p.L1596H (HD) / LargeIndel_fs (PEST)
584	-	p.L1593P (HD)

Supplementary Figure S1

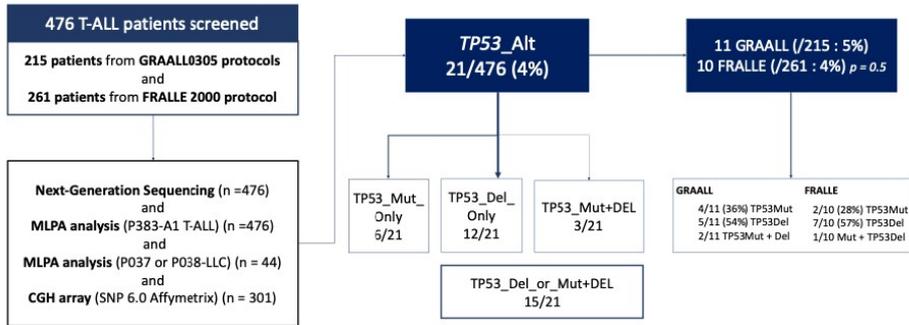


Figure S1: Flow chart of FRALLE2000 and GRAALL0305 patients

Supplementary Figure S2

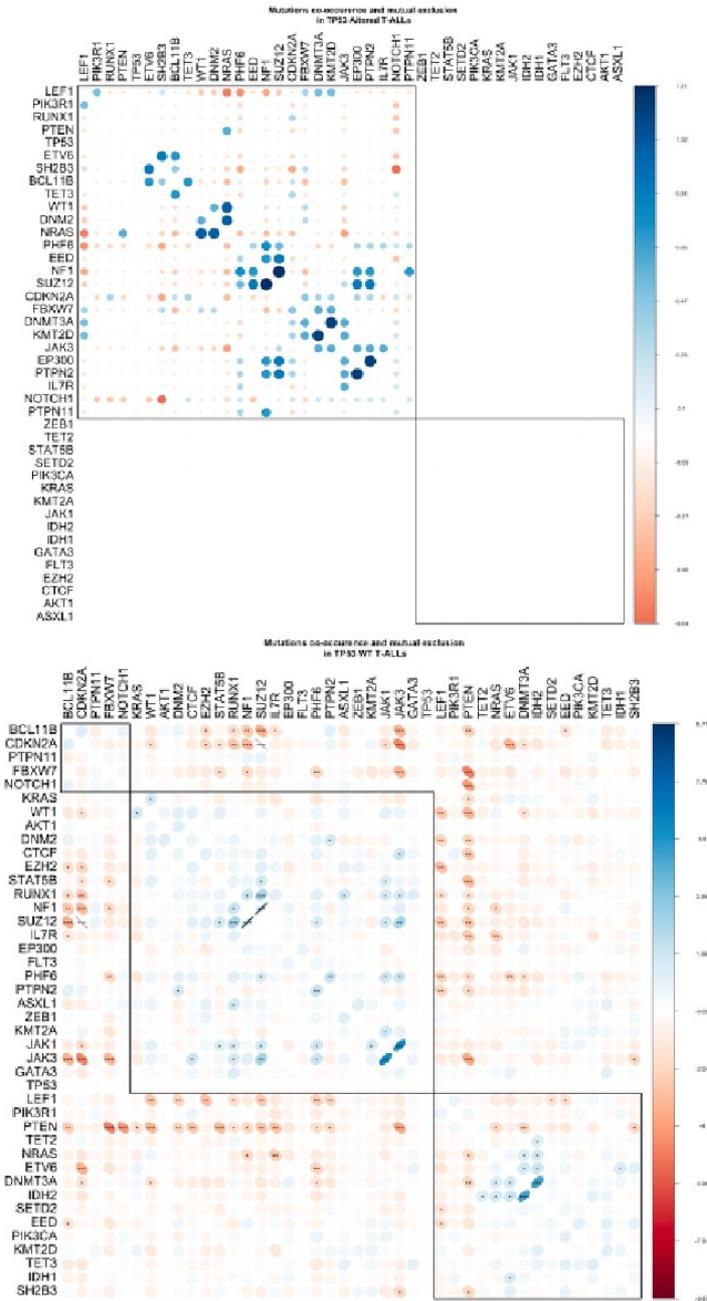


Figure S2: Co-occurrences and mutual exclusions of genetic alterations in *TP53^{Alt}* and *TP53^{WT}* T-ALL.

The colors of the scale bar denote the nature of the correlation, with +1 indicating a perfectly

positive correlation (blue) and -1 indicating a perfectly negative correlation (orange) between two alterations. The significance level of co-occurrences or mutual exclusions are depicted as followed : * indicating a p-value < 0.05, ** a p-value < 0.01 and *** a p-value < 0.001
The co-occurrences and mutual exclusions were computed with the DISCOVER algorithm (R software)

Supplementary Figure S3

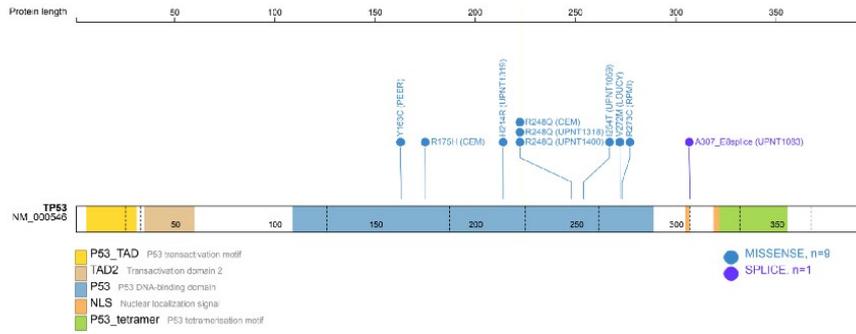


Figure S3 : Lollipop plot indicating *TP53* mutations identified in T-ALL cell lines and T-ALL primograft samples. Lollipop plots was generated with ProteinPaint (<https://pecan.stjude.cloud/#/proteinpaint>)

Supplementary Figure S4

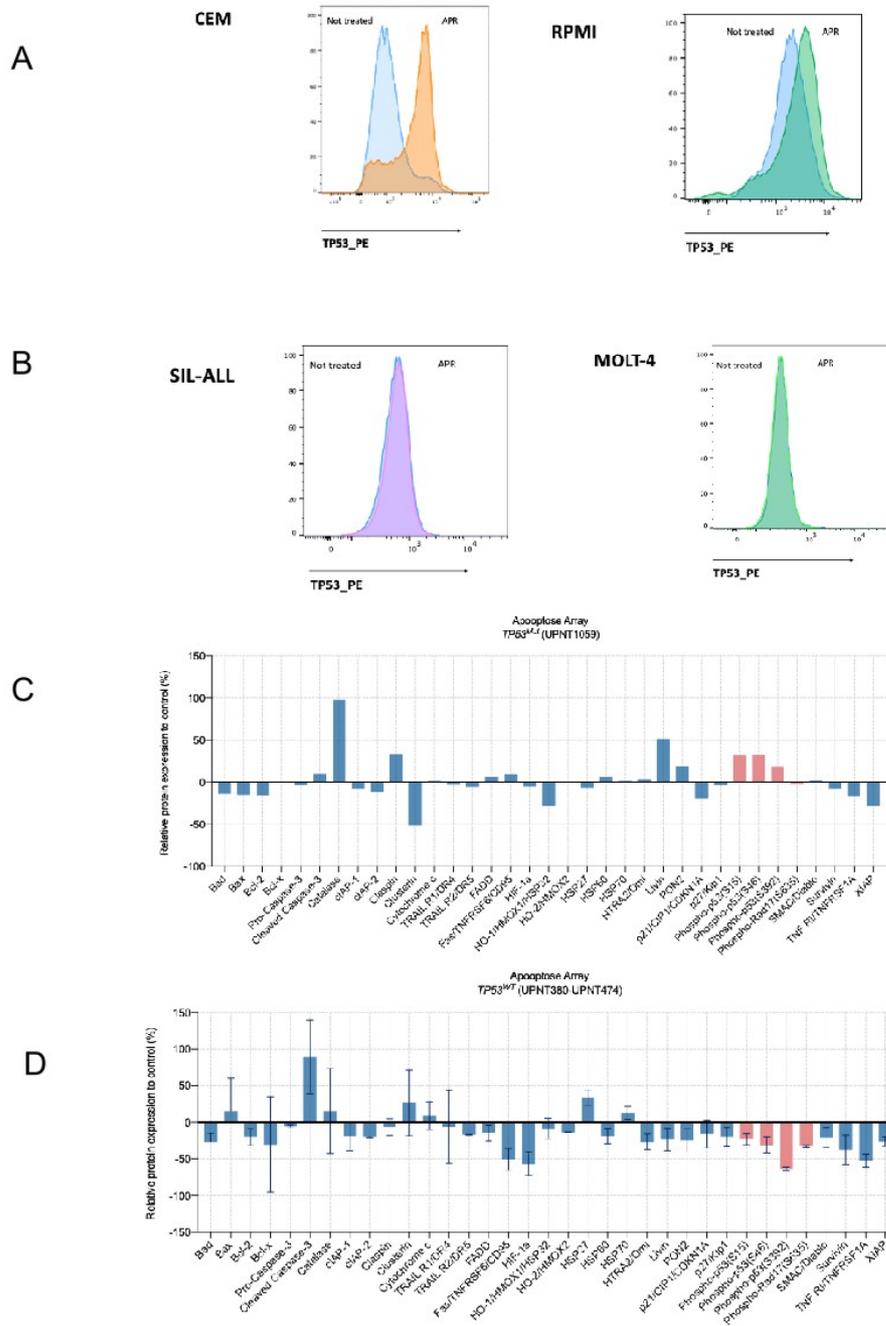


Figure S4:

A. Evaluation of p53 protein expression in T-ALL *TP53^{Mut}* (CEM and RPMI T-cell lines) using flow cytometry. Intracellular immunofluorescent staining was performed using a PE anti-p53 Antibody (BioLegend, San Diego, CA 92121) following 5 μ M APR-246 treatment for 24h

B. Evaluation of p53 protein expression in T-ALL *TP53^{WT}* (SIL-ALL and MOLT4 T-cell lines) using flow cytometry. Intracellular immunofluorescent staining was performed using a PE anti-p53 Antibody (BioLegend, San Diego, CA 92121) following 5 μ M APR-246 treatment for 24h

C. Apoptosis profiling assay in T-ALL *TP53^{Mut}* PDX. The relative level of 35 apoptotic-related proteins was assessed by using the Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit from R&D Systems in T-ALL cells following 5 μ M APR-246 treatment for 24 h vs not treated T-ALL cells. Imaging of the Apoptosis Array Kit was performed on a ChemiDoc XRS, and the results were analyzed with the built-in analysis software.

D. Apoptosis profiling assay in T-ALL *TP53^{WT}* PDX. The relative level of 35 apoptotic-related proteins was assessed by using the Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit from R&D Systems in T-ALL cells following 5 μ M APR-246 treatment for 24 h vs not treated T-ALL cells. Imaging of the Apoptosis Array Kit was performed on a ChemiDoc XRS, and the results were analyzed with the built-in analysis software.

Supplementary Figure S5

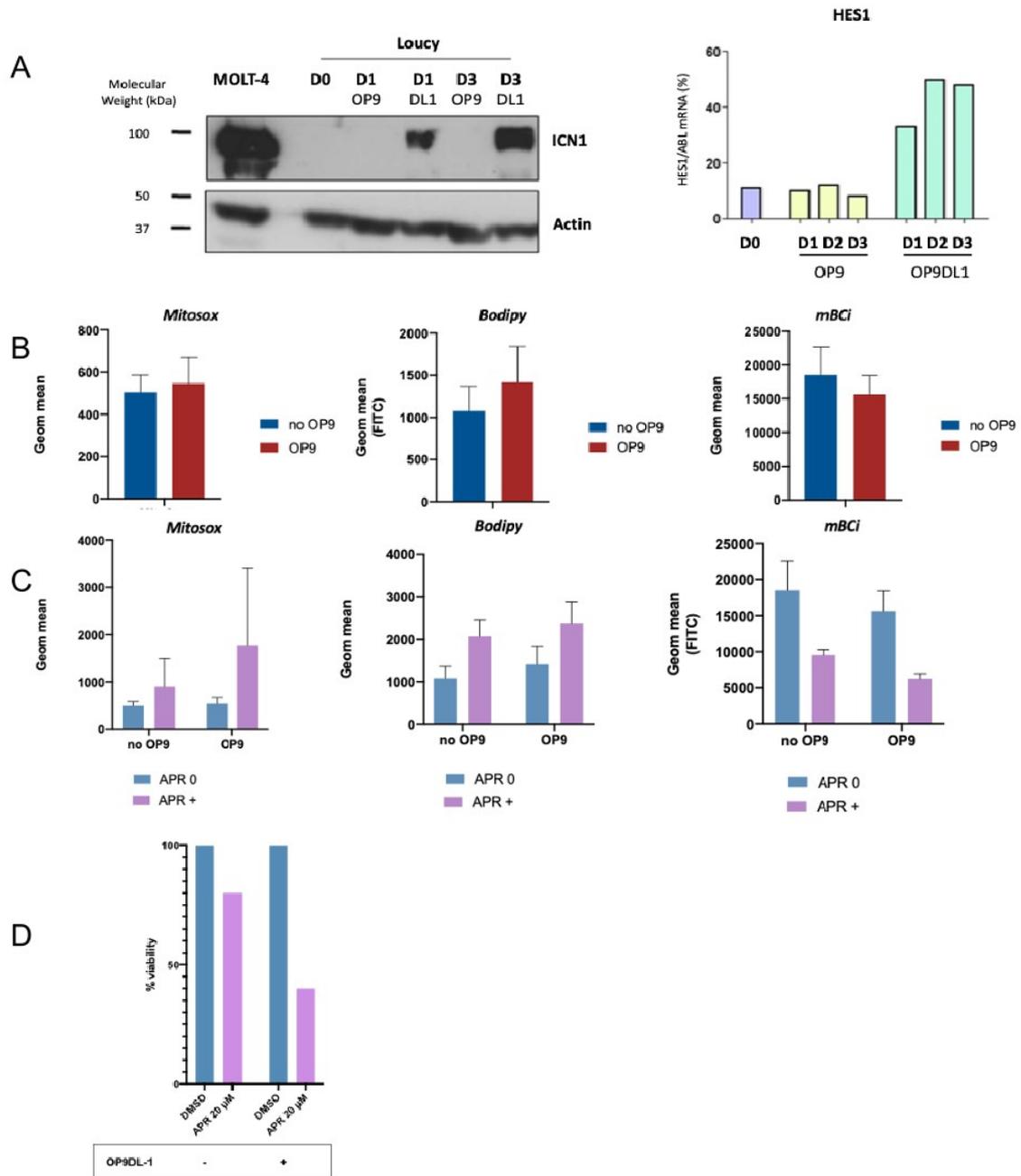


Figure S5:

Co-culture Loucy/OP9-DL1 led to Notch1 pathway activation, as confirmed by both the increase of Notch1-ICN1 protein expression and the upregulation of Notch1 target genes.

A. Western blot (left panel) Relative expression levels of HES1 determined by RT-qPCR in Loucy +/- co-cultured with OP9-DL1 at different times points (Day1 , 2 and 3)

B. Basal levels of ferroptosis (increase in mitochondrial ROS; MitoSox), depletion in reduced glutathione levels ; mBCi, accumulation of peroxidized lipids; Bodipy) in absence of APR-246 treatment in Loucy +/- OP9-DL1.

C. Basal levels of ferroptosis (increase in mitochondrial ROS; MitoSox), depletion in reduced glutathione levels ; mBCi, accumulation of peroxidized lipids; Bodipy) after treatment with APR-246 in Loucy +/- OP9-DL1

D. Loucy exhibited a higher sensitivity to APR-246 when co-cultured on OP9-DL1

Article 5. Cibler les altérations de la voie PI3K/AKT dans les LAL-T

Dans ce travail (en cours de préparation) nous avons exploré l'incidence des altérations de la voie *PI3K/AKT/mTOR* (mutations activatrices d'*AKT1*, de *PIK3CA*, de *PIK3R1* et les altérations de *PTEN* à l'origine d'une perte de fonction ; mutations et/ou délétions) dans les LAL-T. Nous avons établi qu'environ 20% des LAL-T présentaient une altération de la voie PI3K (principalement constitué par les *PTEN^{ALT}*). Nous rapportons l'impact pronostique péjoratif associé à la présence de ces altérations, de façon attendue puisque *PTEN* faisait déjà partie du classifieur historique NFRP.

La fréquence élevée de ces altérations et leurs impacts pronostiques associés contribuent à faire de la voie PI3K une cible thérapeutique privilégiée dans les LAL-T. Dans un premier temps nous avons exploré l'impact métabolique associé à la présence d'une activation dérégulée de la voie PI3K. Nous avons montré que les LAL-T *PI3K^{ALT}* présentaient une dépendance majeure à la voie de la glycolyse à la fois dans les lignées cellulaires de LAL-T mais également dans des modèles de PDX. De façon surprenante, nous avons ensuite montré qu'en situation de privation en glucose les blastes de LAL-T ne présentaient pas de cytotoxicité accrue ou de ralentissement de la prolifération à l'inverse des lignées cellulaires. Ce constat s'explique par l'existence d'une plasticité métabolique intrinsèque aux blastes T primaires leur permettant de « switcher » entre glycolyse et glutaminolyse en cas de coupure d'approvisionnement de leur voie métabolique principale. Ceci explique que l'inhibition seule de la voie PI3K ne permet pas d'obtenir une cytotoxicité significative malgré l'existence d'une activation de la voie PI3K. Il est donc nécessaire de combiner l'inhibition de la glycolyse à une inhibition de sa voie de sauvetage c'est-à-dire de la glutaminolyse.

Afin de démontrer l'intérêt de cette double inhibition métabolique nous avons évalué l'efficacité d'un inhibiteur de PI3K/AKT en situation de privation en glutamine et nous avons confirmé que les LAL-T *PI3K^{ALT}* présentaient une cytotoxicité accrue par rapport aux LAL-T *PI3K^{WT}* dans cette condition. Enfin, nous avons associé un inhibiteur de la glycolyse (temsirolimus) à un inhibiteur de la glutaminolyse (erwinase, une asparaginase particulière qui possède en plus de son activité d'asparaginase classique, une activité glutaminolytique permettant de réduire le stock disponible en glutamine) dans des modèles murins de PDX LAL-T *PI3K^{ALT}* vs *PI3K^{WT}* et alors que les souris traitées par temsirolimus et par erwinase seule ne présentaient pas de gain de survie, seules les LAL-T *PI3K^{ALT}* traitées par l'association

temsirolimus et erwinase ont présenté une augmentation de la survie de façon significative, confirmant l'association synthétique liée à cette double inhibition.

Enfin, 5 patients, âgés de 8 à 50 ans et atteints d'une LAL-T ou d'un LBL-T en rechute ou réfractaire et présentant une altération de la voie PI3K ont été traités par cette association erwinase-temsirolimus. Parmi les 3 patients atteints de LBL-T, ce traitement a conduit à une réduction significative de la taille de la masse médiastinale et a permis d'obtenir une rémission complète pour 2 d'entre eux. Parmi les 2 patients atteints de LAL-T, l'association erwinase-temsirolimus a permis d'obtenir une réponse moléculaire complète, un des 2 patients (en rechute post allogreffe) est toujours en RC près de 4 ans après avoir reçu une consolidation par injection de lymphocyte du donneur (DLI).

Au total ce travail est l'illustration exemplaire de la nécessaire perméabilité qui devrait exister entre les approches biologiques et leurs traductions cliniques. Ainsi, l'identification des altérations de la voie PI3K et la mise en évidence des dérégulations associées mais surtout des mécanismes de sauvetage mis en place par la cellule blastiques en cas d'inhibition de cette voie nous a conduit à proposer une double inhibition métabolique conduisant à une activité synthétique *in vitro* mais également *in vivo* comme en témoigne ces résultats particulièrement encourageants obtenus chez des patients tous lourdement pré-traités et chimioréfractaires, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques dans cette pathologie dont le pronostic demeure extrêmement défavorable en situation réfractaire ou en rechute.

Article V

Titre :

Metabolic plasticity reveals a targetable vulnerability in leukemia

Co-auteurs :

Guillaume P. Andrieu, **Mathieu Simonin**, Aurélie Cabannes-Hamy, Etienne Lengliné, Ambroise Marçais, Marie Émilie Dourthe, Nicolas Boissel, Hervé Dombret, Philippe Rousselot, Olivier Hermine, Vahid Asnafi.

État de article :

En cours de préparation pour soumission.

Nom de la revue :

-

Année de Publication :

-

1 **Metabolic plasticity reveals a targetable vulnerability in leukemia**

2
3 Guillaume P. Andrieu^{1,2}, Mathieu Simonin^{1,2,3}, Aurélie Cabannes-Hamy⁴, Etienne Lengliné⁵,
4 Ambroise Marçais^{1,6}, Alexandre Theron⁷, Marie Émilie Dourthe^{1,2,8}, Nicolas Boissel⁵, Hervé
5 Dombret⁵, Philippe Rousselot⁴, Olivier Hermine^{6,9} and Vahid Asnafi^{1,2,‡}

6 7 **Author Affiliations**

8 ¹ Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital
9 Necker Enfants-Malades, University Paris Cité, Paris, France

10 ² Institut Necker-Enfants Malades (INEM), INSERM U1151, University Paris Cité, Paris, France

11 ³ Department of Pediatric Hematology and Oncology, AP-HP, Armand Trousseau Hospital,
12 University Paris Sorbonne, Paris, France

13 ⁴ Hematology Unit, Versailles Hospital, Versailles, France.

14 ⁵ Laboratory of Hematology and EA3518, University Hospital Saint-Louis, University of Paris,
15 Paris, France

16 ⁶ Hematology Unit, AP-HP, Hôpital Necker Enfants-Malades, Paris, France.

17 ⁷ Department of Pediatric Oncology and Hematology, University of Montpellier, CHU
18 Montpellier, Montpellier, France

19 ⁸ Department of Pediatric Hematology and Immunology, AP-HP, Robert Debré Hospital,
20 University Paris Diderot, Paris, France

21 ⁹ Department of Hematology, INSERM U1163, IMAGINE Institute, Paris University, Necker
22 Hospital, Paris, France

23 [‡] Corresponding author

24
25 **Running title:** A PI3K-driven metabolic vulnerability in T-ALL

26 27 **Corresponding author:**

28 Pr. Vahid Asnafi, Laboratory of Onco-Hematology, Necker-Enfants Malades Hospital, 149 rue de
29 Sèvres, 75015 Paris, France. E-mail: vahid.asnafi@aphp.fr; Phone: +33.144.49.49.14

30
31 **Competing financial interests**

32 The authors declare no competing financial interests.

33

34 **Word count (excluding references):**

35 **Abstract:** 159 words

36 **Main text:** 3643 words

37

38 **Number of Figures/Tables:** 8 figures and 2 tables

39 **Number of Supplementary Figures/Tables:** 2 figures

40 **Number of references:** 41

41

42

43 **ABSTRACT**

44 Metabolic plasticity is a hallmark of cancer cells that permits their adaptation to the
45 microenvironment and favors evading the pressure of chemotherapy. Numerous oncogenic
46 pathways sustain the dynamic rerouting of metabolism circuitries to respond to environmental
47 stresses or therapeutic interventions. The deregulated activation of Notch1 and PI3K signaling,
48 two major drivers of leukemia progression, sustains a metabolic addiction of cancer cells to
49 glutamine and glucose. Leukemias harboring PI3K signaling lesions are defined by aggressive
50 behavior, chemorefractoriness, and dismal clinical outcomes. Here, we identify a metabolic
51 crosstalk linking glutaminolysis and glycolysis driven by PI3K signaling alterations.
52 Pharmaceutical inhibition of mTOR mimics glucose limitation and reveals a singular plasticity of
53 PI3K-altered blasts toward the mobilization of glutamine as a salvage pathway to ensure their
54 survival. Subsequently, the combination of glutamine degradation and mTOR inhibition
55 demonstrates robust anti-leukemic properties in PI3K-driven disease in pre-clinical and clinical
56 settings. We propose a novel therapeutic strategy to circumvent metabolic adaptation and
57 efficiently target PI3K-driven leukemia.

58

59 INTRODUCTION

60 Amongst the hematological malignancies, T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)
61 constitute a class of highly aggressive cancers in children, adolescent, and young adult, marked by
62 aggressive behavior and poor clinical response, notably for relapsing cases.^{1,2} As seen in numerous
63 cancers, genetic lesions leading to aberrant PI3K signaling (PI3KS) are frequent in T-ALL and
64 convey adverse outcomes from limited therapy response to early relapse and dismal survival
65 rates.³⁻⁵

66
67 First coined by Otto Warburg, the avid reliance of tumor cells on glucose to suffice their
68 energetical needs constitutes a hallmark of cancer.⁶ Major advances in the past three decades have
69 described the metabolic liabilities of tumor cells such as glucose and glutamine dependency⁷⁻⁹,
70 and the impact of their oncogenic lesions on their capacity to rewire metabolic networks. Metabolic
71 plasticity confers to cancer cells the ability to adapt to stressful environments as such encountered
72 during rapid outgrowth or under the pressure of therapy.^{10,11} Major T-ALL oncogenic drivers, such
73 as PI3K/Akt/mTOR pathway, Notch1, or c-Myc, contribute to metabolic rewiring in leukemic
74 cells and treatment failure.¹¹⁻¹³ Hence, a better understanding of the metabolic circuitries
75 permitting such flexibility would pave the way to identifying new targets to hinder the metabolic
76 adaptation of leukemic blasts and leverage the therapeutic response.

77
78 Here we provide the largest comprehensive analysis of PI3KS alterations in both adult and
79 pediatric T-ALL, underpinning the poor prognosis impact conveyed by PI3KS alterations, and
80 urging the need to develop innovative therapies for these patients. While a growing body of
81 evidence suggests that the PI3KS represents an attractive target for innovative therapy of

82 hematological malignancies^{5,14,15}, no study has hitherto explored its clinical targeting, frequently
83 altered and associated with poor clinical outcomes in T-ALL.

84

85 **RESULTS**

86 **PI3K signaling alterations define an aggressive subgroup of leukemia**

87 We report the incidence and the clinical impact of the genetic alterations targeting PI3KS core
88 genes *PTEN*, *PIK3R1*, *PIKCA*, and *AKT1* in two cohorts of pediatric and adult T-ALL. Loss-of-
89 function (LOF) mutations and/or deletions of *PTEN*, and gain-of-function (GOF) mutations of
90 *PIK3CA*, *PIK3R1*, or *AKT1* were analyzed in a series of 476 patients enrolled in the FRALLE2000
91 (n = 261) and the GRALL03-05 (n = 215) studies. Their baseline characteristics are summarized
92 in Table 1.

93

94 The overall incidence of PI3KS alterations was 18.3% (87/476 patients) with similar incidences in
95 the pediatric and the adult cohorts (**Figure. 1a and Supplementary Fig. 1a**). *PTEN* LOF
96 accounted for the majority of PI3KS alterations and was detected in 14.5% (69/476) of the patients
97 (**Figure. 1b and Supplementary Fig. 2**). GOF mutations of *PIK3R1*, *PIKCA*, and *AKT1* were
98 sparsely detected (3.5%, 1.4%, and 0.4% respectively), and often co-occurred with *PTEN*
99 inactivation (Fig. 1b).

100

101 The extensive clinical, phenotypic, and molecular characterization of the patients are listed in
102 Table 1. PI3KS-altered (PI3KS^{ALT}) patients did not significantly differ in sex, age, and central
103 nervous system (CNS) involvement but presented with a more pronounced hyperleukocytosis at
104 diagnosis (median leukocyte count of 116 G/l (1-770) vs 51 G/l (0-980), $p < 0.001$) than patients
105 with a wild-type PI3KS (PI3KS^{WT}).

106

107 As expected, PI3KS^{ALT} T-ALL displayed more frequently a mature $\alpha\beta$ phenotype (30/75, 40% vs
108 36/344, 10%, $p < 0.001$) and were enriched in the *SIL-TALI*-positive subtype (29/87, 33% vs
109 28/389, 7%, $p < 0.001$). Consistent with this, PI3KS^{ALT} T-ALL negatively correlated with
110 abnormalities known to be associated with immature phenotypes such as IL7R pathway alterations
111 (e.g. *JAK3* mutations found in 7% of PI3KS^{ALT} vs 22% in PI3KS^{WT}, $p < 0.001$ and *IL7R* mutations
112 in 5% vs 16%, $p = 0.004$), alteration of epigenetic regulators (e.g. *DNMT3A* mutations not found
113 in PI3KS^{ALT} vs 9% in PI3KS^{WT}; *WT1* mutations observed in 6% of PI3KS^{ALT} vs 15% in PI3KS^{WT},
114 $p = 0.02$), and to a lesser extent with Polycomb complex PRC2 alterations (*SUZ12* alterations
115 found in 11% of PI3KS^{ALT} vs 17% in PI3KS^{WT}, $p = 0.2$; *EED* mutations in 2% of PI3KS^{ALT} vs
116 5%, $p = 0.6$) (**Figure. 2**).

117
118 PI3KS^{ALT} patients had a higher relapse risk; 83% (72/87) vs 35% (137/389), as defined by our
119 published risk classifier.³ PI3KS alterations convey a poor prednisone response defined by a
120 peripheral blood blast count $> 1.0G/l$ at the end of the induction phase; 58% vs 42%, $p = 0.01$.
121 Despite similar complete remission rates, patients carrying PI3KS^{ALT} had a shorter overall survival
122 (OS); 5y-OS: 58% vs 74%, hazard ratio: 1.70, 95% CI (1.16 - 2.50), $p = 0.007$, a shorter event-
123 free survival (EFS); 5y-EFS: 49% vs 65%, hazard ratio: 1.59, 95% CI (1.13 - 2.23), $p = 0.008$, and
124 an increased cumulative incidence of relapse (CIR); 5y-CIR: 39% vs 27%; specific hazard ratio
125 (SHR) 1.68, 95% confidence interval (CI) (1.12 - 2.51), $p = 0.01$ (**Figures.1c-e**).

126
127 The aggressiveness of PI3KS^{ALT} T-ALL is deeply imprinted in the blasts, as patient-derived
128 xenografts (PDX) generated from these primary samples recapitulated their clinical characteristics
129 marked by a rapid expansion in mice compared to wild-type cases (**Figures. 1f-g**). Remarkably,

130 PI3KS alterations were stably conserved from primary samples to PDX, indicating that these
131 oncogenetic lesions drive T-ALL progression (**Supplementary Figure. 2**). Altogether, PI3KS^{ALT}
132 T-ALL defines an aggressive subgroup with dismal outcomes.

133 **Aberrant PI3K signaling polarizes leukemia metabolism towards glycolysis**

134 The oncogenic activation of the PI3K signaling pathway sustains leukemia expansion *via* multiple
135 mechanisms including cell growth, proliferation, metabolism, and chemosensitivity modulation.
136 We screened a series of PDX by phosflow to determine PI3KS activity. Sustained phosphorylation
137 of Akt (pAkt^{S473}), the direct substrate of PI3K, and subsequent mTOR target S6 (pS6^{T235/236}) were
138 detected in PI3KS^{ALT} PDX (**Figure 3a**). Interestingly, mTOR target 4E-BP1 (p4E-BP1^{T37/46}) was
139 not found differentially activated between the two groups. These data confirm the robust oncogenic
140 activation of PI3K and downstream master regulator mTOR in this subgroup in comparison with
141 wild-type cases.

142
143 To further explore the transcriptomic and metabolic profile of PI3KS^{ALT} T-ALL, we analyzed a
144 series of 160 primary T-ALL samples by RNA sequencing (RNA-seq). Differential expression
145 analysis performed on a subset of 2,141 expressed metabolic genes revealed an upregulation of
146 transcripts related to glycolysis and TCA cycle in PI3KS^{ALT} T-ALL (**Figure 3b**). Conversely,
147 genes encoding for enzymes and regulators of nicotinate, amino acids, and steroids were found
148 down-regulated. Enrichment analyses carried out on differentially expressed metabolic genes in
149 PI3KS^{ALT} T-ALL versus wild-type cases revealed that upregulated genes were mapped to the TCA
150 cycle, the oxidative phosphorylation and the electron transport chain, and the fatty acid
151 metabolism, three major metabolic pathways strongly wired to glycolysis and its derivatives (**Figure**
152 **3c**), along with mTORC1 signaling. Downregulated genes were related to steroids and cholesterol

153 synthesis and amino acid metabolism. Gene set enrichment analysis (GSEA) confirmed that
154 oxidative phosphorylation and fatty acid metabolism are two important features of PI3K signaling-
155 altered T-ALL (**Figure 3d**).

156

157 Given the preponderant role of PI3K/Akt/mTOR in the control of glucose metabolism, we
158 evaluated the glycolytic activity in our settings. Glucose uptake was found to increase in PI3KS^{ALT}
159 T-ALL cell line models *versus* wild-type, indicative of enhanced glycolytic activity (**Figure. 4a**).
160 Hence, we examined the sensitivity of PI3KS^{ALT} T-ALL to glucose deprivation. While PI3KS^{WT}
161 T-ALL cell lines tolerated glucose limitation, altered cell lines did not survive in such culture
162 conditions (**Figure. 4b**), highlighting the strong reliance on glucose to sustain the energetical needs
163 of these models. Importantly, PDX models carrying PI3KS^{ALT} also presented a stronger glucose
164 consumption than wild-type cases (**Figure 4c**). Robust correlations were observed between the
165 phosphorylation of PI3KS effectors and glucose uptake in both PI3KS^{WT} and PI3KS^{ALT} PDX
166 (pAkt: $R^2 = 0.659$, $p = 0.0004$ in WT, $R^2 = 0.922$, $p = 0.0001$ in ALT; pS6: $R^2 = 0.501$, $p = 0.0046$
167 in WT, $R^2 = 0.533$, $p = 0.0039$ in ALT) (**Figure 4d**). These results reflect the coupling of PI3KS
168 and glucose consumption in T-ALL. Hence, we tested if PI3KS targeting could hinder glucose
169 accessibility to leukemic blasts. Both PI3K and mTORC1 inhibition by wortmannin and
170 temsirolimus respectively reduced glucose consumption in PI3KS-driven blasts, confirming the
171 modulation of glycolysis by sustained PI3K/Akt/mTOR signaling (**Figure. 4e**). However, despite
172 elevated signaling activity, pharmaceutical inhibition of PI3K or mTORC1 demonstrated poor
173 efficacy *ex vivo* on PI3KS^{ALT} blasts (**Figure. 4f**), reinforcing the concept that the sole inhibition
174 of PI3KS components has limited efficacy in cancer.¹⁶ We thus examined the capacity of PI3KS^{ALT}
175 blasts to survive glucose limitation. Intriguingly, in opposition to T-ALL cell lines models, glucose

176 deprivation of PDX only had limited cytotoxicity and moderate reduction of blast proliferation
177 with PI3K signaling alterations (**Figures. 4g-h**). Furthermore, glucose limitation did not impair
178 the strong PI3KS activation seen in PI3KS^{ALT} blasts, as phosphorylation levels of Akt and S6
179 remained elevated under deprivation (**Figure. 4i**). Importantly, ATP levels in these blasts remained
180 unchanged under glucose deprivation (**Figure. 4j**), suggesting that despite elevated basal
181 glycolytic rates, blasts with aberrant activation of the PI3K pathway can use alternative metabolic
182 pathways to cope with glucose limitation and maintain their energy balance. Hence, the metabolic
183 plasticity driven by PI3KS alterations may critically contribute to the survival of leukemic blasts
184 in nutrient-deprived environments.

185

186 **The metabolic plasticity of PI3K-altered leukemia confers a vulnerability to glutamine** 187 **metabolism**

188 To explore the metabolic circuitries of PI3KS^{ALT} T-ALL sustaining blast survival upon glucose
189 limitation, we conducted a metabolome profiling of a series of 14 PDX (7 WT, 7 ALT) cultured
190 *ex vivo* in complete medium or without glucose. Glucose deprivation drastically suppressed
191 glycolysis intermediates such as glucose, glucose 6-phosphate, glyceraldehyde 3-phosphate,
192 pyruvate, and lactate, irrespective of PI3KS mutational status (**Figure. 5a**). Of note, glucose
193 limitation induced an increase of several amino acids including asparagine metabolism
194 intermediates in both subgroups, likely due to the activation of the amino acid response pathway.
195 Critically, glutamine and its derivate glutamate were found consumed in PI3KS^{ALT} T-ALL, when
196 unchanged in wild-type cases. These results strongly suggest that glutamine mobilization
197 participates in the survival of PI3KS^{ALT} blasts when glucose availability is limited. Enrichment
198 analyses on the pool of deregulated metabolites upon glucose depletion confirmed the

199 downregulation of glycolysis. Related metabolic pathways such as the pentose phosphate pathway,
200 pyruvate metabolism, and TCA cycle were also found suppressed in PI3K^{WT} samples (**Figure.**
201 **5b**). Importantly, glutaminolysis was confirmed as a hallmark of PI3K^{ALT} T-ALL upon glucose
202 limitation. Network analyses of differentially detected metabolites upon glucose deprivation
203 validated a downregulated core axis linking glycolysis, pyruvate metabolism, and TCA cycle
204 irrespective of PI3K status (**Figure. 5c**). Additionally, a nitrogen network supported by glutamine
205 to fuel amino acid biosynthesis such as arginine was only revealed in PI3K^{ALT} T-ALL. While
206 glycolysis intermediates and products pyruvate and lactate were drastically reduced under glucose
207 deprivation in both groups, glutamine and glutamate were only found consumed in PI3K^{ALT} blasts
208 (**Figure. 5d**). Of note, while TCA cycle intermediates such as α -ketoglutarate, fumarate, and citrate
209 were found reduced in PI3K^{WT}, these metabolites were unchanged in PI3K^{ALT} blasts,
210 confirming the mobilization of glutamine in an anaplerotic flux to support the TCA in these
211 conditions (**Figure. 5d**). To validate the metabolic plasticity between glycolysis and
212 glutaminolysis in PI3K^{ALT} T-ALL, we measured glucose uptake in blasts either starved for
213 glucose or glutamine. PI3K^{WT} blasts did not significantly change their glucose consumption in
214 deprived conditions. However, glucose uptake was markedly increased as a response to glutamine
215 limitation (**Figure. 5e**). Altogether, our results identified glutamine and glutaminolysis as a
216 metabolic circuitry activated in PI3K^{ALT} blasts upon glucose deprivation to support their survival.

217

218 **Glucose limitation reveals a synthetic lethality to glutamine targeting in PI3K-driven** 219 **leukemia**

220 We sought to functionally demonstrate the importance of glutamine mobilization to rescue glucose
221 limitation in PI3K^{ALT} T-ALL. The conversion of glutamine into glutamate by glutaminases

222 (GLS) is the first and rate-limiting step of glutaminolysis. Hence, we evaluated the sensitivity to
223 GLS small-molecule inhibitor CB-839. While moderate cytotoxicity was observed *ex vivo* in
224 complete medium conditions, GLS inhibition efficiently eradicates blasts in absence of glucose IN
225 PI3KS^{ALT} blasts (**Figure. 6a**), supporting that glutamine mobilization sustains the adaptation of
226 blasts to metabolic stress. We have shown that glycolytic flux is controlled by mTORC1 in our
227 models (**Figures. 4d-e**). Hence, we examined whether mTOR inhibition, by mimicking the effect
228 of glucose limitation, synergizes with glutaminolysis inhibition in PI3KS^{ALT} T-ALL. As
229 previously observed, mTORC1 inhibition by temsirolimus showed limited efficacy (**Figure. 4g**
230 and **Figure. 6b**). Of note, similar results were obtained with various inhibitors of mTORC1 or/and
231 mTORC2 (data not shown), indicating that PI3KS^{ALT} blasts can resist mTOR inhibition.
232 Conversely, temsirolimus had a strong cytotoxic effect upon glutamine limitation (**Figure 6b**).
233 Additionally, while single inhibition of either glutaminolysis or mTOR was inefficient, the
234 combinatory treatment showed a strong synergy specifically in PI3KS^{ALT} blasts (**Figures. 6c-d**).
235 Hence, our data robustly illustrate the metabolic crosstalk between glycolysis and glutaminolysis
236 in PI3K-driven T-ALL.

237
238 L-asparaginase is commonly used in the treatment of T-ALL exploiting the inability of the blasts
239 to synthesize *de novo* asparagine due to the lack of asparagine synthetase^{17,18}. *Erwinia*
240 *chrysanthemi*-derived L-asparaginase (ErwinaseTM) has an affinity toward glutamine and presents
241 a glutaminase activity.^{19,20} Hence, ErwinaseTM treatment can be used to deplete the extracellular
242 asparagine and glutamine levels. While PI3KS^{WT} PDX displayed a highly heterogeneous response
243 to erwinase alone or combined with temsirolimus, a strong cytotoxic effect was observed for the
244 combination in PI3KS^{ALT} blasts (**Figure. 6e**). Importantly, the use of another L-asparaginase

245 derived from *E. Coli* (Kidrolase™) failed to reproduce these results and poorly synergizes with
246 temsirolimus (**Figure. 6f**). Critically, while both L-asparaginases efficiently depleted extracellular
247 and intracellular asparagine to produce L-aspartic acid, Erwinase™ also reduces glutamine pools
248 and increases the availability of glutamate, conversely to Kidrolase™ (**Figure. 6g**). These data
249 strongly suggest that the efficacy of Erwinase™ in the combination with temsirolimus strongly
250 relies on its glutaminolytic activity. Taken together, these results strongly support the combination
251 of mTOR inhibitors and glutamine metabolism targeting compounds such as CB-839 or
252 Erwinase™ in the treatment of PI3KS^{ALT} T-ALL. To address this, we tested this approach *in vivo*
253 on PI3KS^{ALT} xenografts in a pre-clinical setting of two cycles of five-day-long daily gavage with
254 temsirolimus and/or intravenous injection of Erwinase™ every two days. The aggressive behavior
255 of this subgroup of T-ALL was exemplified by the drastically limited survival seen in the vehicle
256 arm (**Figure. 6h**). While Erwinase™ treatment did not prolong survival, with a moderate effect of
257 temsirolimus, the combined treatment resulted in a marked improvement in the survival of mice.
258 Altogether, our data indicate that the unique metabolic plasticity conveyed by PI3KS^{ALT} confers a
259 vulnerability/synthetic lethality that can be clinically targeted to treat T-ALL.

260

261 **Clinical evaluation of Erwinase and temsirolimus association in PI3K-driven T-ALL and T-** 262 **lymphoblastic lymphoma.**

263 We report the clinical course and outcomes of five patients suffering from refractory or relapse
264 (R/R) T-ALL or T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LL) harboring PI3KS^{ALT} and treated with
265 association of *Erwinia chrysanthemi*-derived L-asparaginase (Erwinase™) and temsirolimus
266 (Torisel™) (ET). All five patients were heavily pre-treated at the time of ET initiation. The median
267 age at ET initiation was 26 years (8-50 years) and the sex ratio (M/F) was 3/2. Among the five

268 patients, three suffered from T-LL and two from T-ALL. The two patients with T-ALL suffered
269 from relapses following allogeneic stem cell transplantation (ASCT), while the three remaining
270 patients with T-LL received up to three different lines of polychemotherapy before ET treatment
271 (**Table 2 and Figure. 7a and b**). Based on limited but promising results previously published
272 reporting the efficacy of venetoclax-based therapies in R/R T-ALL/LL, three patients also received
273 venetoclax combined with the ET association. All five patients achieved a response within one
274 month after one or two courses. The two patients suffering from relapsed T-ALL achieved negative
275 minimal residual disease (MRD) and patients with R/R T-LL experienced a significant decrease
276 of the mediastinal mass based on early volumetric and/or metabolic evaluation assessment
277 (**Figure. 8**). Four out of five patients experienced expected and acceptable side effects related to
278 the ET combination. However, the fifth patient experienced significant and severe toxicities
279 (hematological, digestive, and infectious adverse events) that led to the discontinuation of the
280 erwinase injection (UPNT-1402). Overall, the ET (\pm venetoclax) association was well tolerated.
281 After achieving CR, three patients received consolidation therapy consisting of allogeneic SCT in
282 two patients (LLT-147, LLT-244) while the previously allografted third patient (UPNT-1401)
283 received donor lymphocyte infusion (DLI). One patient who received ASCT after achieving CR
284 post-ET therapy eventually died from allograft-related toxicity (LLT-147, acute respiratory
285 distress syndrome). The patient who received a DLI remains in CR four years after the infusion
286 (UPNT-1401), and so does the third patient who was recently allografted (LLT-244). For the two
287 remaining patients, erwinase was discontinued due to toxicity for UPNT-1402, and to supply
288 problems (interruption of production) for LLT-242. These two patients rapidly progressed after
289 the discontinuation of ET treatment and ultimately died from disease progression.

290

291 Taken together, we unveiled a novel and promising treatment combining an asparagine and
292 glutamine degrader (ErwinaseTM) with a PI3KS inhibitor (temsirolimus, ToriselTM) that should be
293 considered as a therapeutic option in a bridge-to-transplant approach for R/R T-ALL/LL harboring
294 PI3KS deregulation. We show that metabolic plasticity conveys a unique and targetable
295 vulnerability in PI3KS-driven leukemia that show promising results in pre-clinical and clinical
296 settings.

297

298 **DISCUSSION**

299 Relapsed or refractory T-ALL/LL is associated with extremely poor prognosis, in part due to
300 chemoresistance acquisition and the scarcity of the therapeutic armamentarium currently available
301 for T-ALL/LL^{21,22}. The dismal impact on clinical outcomes conveyed by *PTEN* alterations in T-
302 ALL is long known and well reported^{3,14,23–25}. We and others have demonstrated how *PTEN*
303 oncogenetic lesions participate in the constitution of a genetic classifier that stratifies the relapse
304 risk for T-ALL patients^{4,23,24}. Additional lesions of PI3KS core components are frequently
305 observed in hematological malignancies including T-ALL. In this study, we provide the largest
306 comprehensive evaluation of PI3KS alterations and their clinical impact. As observed for *PTEN*,
307 genetic lesions of PI3KS leading to unrepressed PI3KS activation define a subgroup of aggressive
308 T-ALL with unfavorable outcomes.

309

310 The major metabolic hallmarks of tumor cells are the Warburg effect and glutamine dependency
311^{6,9}. Lactic fermentation as an endpoint of glycolysis ensures continuous ATP production for cancer
312 cells independently of other variables like oxygen availability, but it comes with a cost. Pyruvate
313 conversion into lactate limits the production of acetyl-CoA available to fuel the TCA cycle. To
314 compensate for this, cancer cells often deaminate glutamine into glutamate and subsequent a-
315 ketoglutarate to produce an anaplerotic flux that replenishes the TCA cycle. Hence, tumor cells
316 have imprinted metabolic flexibility that connects glucose consumption and glutamine
317 mobilization. While being a non-essential amino acid, glutamine is recognized as one of the most
318 critical metabolites for cancer cells^{8,26}. Outgrowing tumor cells engulf more glutamine than they
319 produce, rendering them highly dependent on the available extracellular pools of this amino acid
320 in their microenvironment. Critically, many oncogenes that drive leukemia oncogenesis and

321 progression weight on glutamine metabolism. For instance, aberrant Notch1 activation, coupled
322 with downstream effector c-Myc, sustains glutamine uptake and glutaminolysis machinery ^{12,27,28}.
323 Anti-Notch1 interventions such as gamma-secretase inhibitors can limit glutamine mobilization
324 but have demonstrated limited efficacy and strong toxicities, undermining their clinical
325 consideration. The mutational landscape of T-ALL is rather complex and diverse ²⁹. As a result,
326 multiple oncogenic activation or tumor suppressor gene silencing may co-occur in the blasts.
327 *PTEN* inactivation has been linked to promoting metabolic plasticity and confers exacerbated
328 glycolytic capacities to leukemic blasts ¹². In another model of colorectal cancer, the oncogenic
329 activation of *PIK3CA* has been shown to reprogram the cell metabolism to promote glutamine
330 usage ¹³. *PIK3CA* encodes the catalytical subunit of the isoform PI3Ka. While rarely found altered
331 in T-ALL (1.5% of mutated cases in our cohort), we have recently reported that *PIK3CA* mutations
332 are more frequent in T-LL, a hematological malignancy closely related to T-ALL ³⁰. In line with
333 this, our results unravel a metabolic plasticity conveyed by PI3KS alterations between glucose and
334 glutamine usage when one metabolite becomes limiting. Interestingly, under the scope of our
335 study, it appeared that PI3KS^{WT} T-ALL were not capable of such polarization. Whether this is a
336 specificity of PI3KS^{ALT} T-ALL because of their oncogenic context, or can it be observed in other
337 oncogenotypes remains to be determined by further investigation.

338

339 Based on this metabolic singularity, we proposed a novel treatment combining an asparagine and
340 glutamine degrader (erwinase) with a PI3KS inhibitor (temsirrolimus) that presents promising
341 efficacy in T-ALL/LL harboring PI3KS deregulation. While the co-targeting of glycolysis and
342 glutaminolysis is not a novel concept, the difficulty to use clinically-relevant agents targeting such
343 major metabolic pathways has dampened the efforts to translate pre-clinical studies. Our approach

344 takes advantage of clinically approved molecules that are standards of cancer therapy. We
345 emphasize the intricate connection between PI3KS and glucose consumption. While PI3K
346 inhibitors fail to demonstrate cytotoxic effects, the use of small-molecule inhibitors of downstream
347 effectors such as mTOR-targeting compounds is rather promising. Among them, temsirolimus has
348 proven its safety and demonstrated efficacies in various models. Erwinase, an L-asparaginase that
349 also exhibits an L-glutaminase activity^{20,31}, is widely used in clinics to exploit the vulnerability of
350 leukemic blasts to extracellular pools of asparagine. Our data demonstrate that the efficacy of
351 erwinase resides in its glutaminase activity, as kidrolase, another L-asparaginase without direct
352 lysis capacity of glutamine, fails to demonstrate any cytotoxic effect. However, of note, kidrolase
353 provokes a reduction in glutamine pools *in vivo*, likely due to cell adaptation to asparagine
354 deprivation^{19,32}. However, such reduction is a result of glutamine consumption that does not mimic
355 the enzymatic degradation by erwinase that prevents its contribution to underlying metabolisms.
356 Similar glutamine targeting therapies have been underlined, usually combined with anti-
357 mitochondrial agents, to exploit the dependence of leukemic cells and other cancer cells on these
358 metabolic circuitries^{33,34}. Venetoclax, an inhibitor of the BCL2 family, has been approved for
359 patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and acute myeloid leukemia^{35,36} and has been
360 reported to be clinically active in patients with R/R T-ALL, in addition, to salvage regimens³⁷⁻⁴¹.
361 Critically, we highlighted the efficacy and safety related to the combination of ET and venetoclax
362 in T-ALL/T-LL patients. Hence, the elucidation of the metabolic liabilities of leukemic blasts will
363 pave the way for the elaboration of novel therapies combining anti-metabolite intervention with
364 standard-of-care chemotherapy or targeted strategies for the patients.

365

366 **REFERENCES**

- 367 1. Asnafi, V. *et al.* Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic
368 leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. *Blood* **101**,
369 2693–703 (2003).
- 370 2. Desjonqueres, A. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia relapsing after first-line pediatric-
371 inspired therapy: a retrospective GRAALL study. *Blood Cancer J* **6**, e504 (2016).
- 372 3. Palomero, T. *et al.* Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in
373 T-cell leukemia. *Nat Med* **13**, 1203–10 (2007).
- 374 4. Trinquand, A. A. *et al.* Towards molecular stratification of pediatric T-cell lymphoblastic
375 lymphomas based on Minimal Disseminated Disease and NOTCH1/FBXW7 mutational status:
376 the French EURO-LB02 experience. *medRxiv* 2020.09.08.20189829-2020.09.08.20189829 (2020)
377 doi:10.1101/2020.09.08.20189829.
- 378 5. Tesio, M., Trinquand, A., Macintyre, E. & Asnafi, V. Oncogenic PTEN functions and
379 models in T-cell malignancies. *Oncogene* **35**, 3887–96 (2016).
- 380 6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**,
381 646–674 (2011).
- 382 7. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg
383 effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
- 384 8. Yang, L., Venneti, S. & Nagrath, D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism.
385 *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **19**, 163–194 (2017).
- 386 9. Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell*
387 *Metab.* **23**, 27–47 (2016).
- 388 10. Fendt, S.-M., Frezza, C. & Erez, A. Targeting Metabolic Plasticity and Flexibility
389 Dynamics for Cancer Therapy. *Cancer Discov.* **10**, 1797–1807 (2020).
- 390 11. Rashkovan, M. & Ferrando, A. Metabolic dependencies and vulnerabilities in leukemia.
391 (2019) doi:10.1101/gad.326470.
- 392 12. Herranz, D. *et al.* Metabolic reprogramming induces resistance to anti-NOTCH1 therapies
393 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **21**, 1182–9 (2015).
- 394 13. Hao, Y. *et al.* Oncogenic PIK3CA mutations reprogram glutamine metabolism in
395 colorectal cancer. *Nat. Commun.* **7**, 1–13 (2016).

- 396 14. Gutierrez, A. *et al.* High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute
397 lymphoblastic leukemia. *Blood* **114**, 647–50 (2009).
- 398 15. Evangelisti, C. *et al.* Targeting Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt/mTOR pathways in T-cell
399 acute lymphoblastic leukemia. *J. Cell. Physiol.* **235**, 5413–5428 (2020).
- 400 16. Vanhaesebroeck, B., Perry, M. W. D., Brown, J. R., André, F. & Okkenhaug, K. PI3K
401 inhibitors are finally coming of age. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 741–769 (2021).
- 402 17. Miller, H. K., Salser, J. S. & Balis, M. E. Amino acid levels following L-asparagine
403 amidohydrolase (EC.3.5.1.1) therapy. *Cancer Res.* **29**, 183–187 (1969).
- 404 18. Touzart, A. *et al.* Epigenetic Silencing Affects L-Asparaginase Sensitivity and Predicts
405 Outcome in T-ALL. *Clin. Cancer Res.* **25**, 2483–2493 (2019).
- 406 19. Chan, W. K. *et al.* Glutaminase activity of L-asparaginase contributes to durable preclinical
407 activity against acute lymphoblastic leukemia. **18**, 1587–1592 (2019).
- 408 20. Emadi, A. *et al.* Asparaginase *Erwinia chrysanthemi* effectively depletes plasma glutamine
409 in adult patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.*
410 **81**, 217–222 (2018).
- 411 21. Hunger, S. P. & Raetz, E. A. How I treat relapsed acute lymphoblastic leukemia in the
412 pediatric population. *Blood* **136**, 1803–1812 (2020).
- 413 22. Tzoneva, G. *et al.* Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive
414 chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat. Med.* **19**, 368–371 (2013).
- 415 23. Trinquand, A. *et al.* Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk
416 classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute
417 Lymphoblastic Leukemia study. *J Clin Oncol* **31**, 4333–42 (2013).
- 418 24. Petit, A. *et al.* Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction
419 in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **131**, 289–300 (2018).
- 420 25. Tesio, M. *et al.* Age-related clinical and biological features of PTEN abnormalities in T-
421 cell acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* **31**, 2594–2600 (2017).
- 422 26. Zhang, J., Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. Cancer cell metabolism: the essential role of
423 the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J.* **36**, 1302–1315 (2017).
- 424 27. Gao, P. *et al.* c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase
425 expression and glutamine metabolism. *Nature* **458**, 762–765 (2009).
- 426 28. Qing, G. *et al.* ATF4 Regulates MYC-Mediated Neuroblastoma Cell Death upon

- 427 Glutamine Deprivation. *Cancer Cell* **22**, 631–644 (2012).
- 428 29. Belver, L. & Ferrando, A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic
429 leukaemia. *Nat Rev Cancer* **16**, 494–507 (2016).
- 430 30. Bontoux, C. *et al.* Oncogenetic landscape of T-cell lymphoblastic lymphomas compared
431 to T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mod. Pathol.* 1–9 (2022) doi:10.1038/s41379-022-01085-
432 9.
- 433 31. Narta, U. K., Kanwar, S. S. & Azmi, W. Pharmacological and clinical evaluation of l-
434 asparaginase in the treatment of leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **61**, 208–221 (2007).
- 435 32. Grima-Reyes, M. *et al.* Tumoral microenvironment prevents de novo asparagine
436 biosynthesis in B cell lymphoma, regardless of ASNS expression. *Sci. Adv.* **8**, eabn6491 (2022).
- 437 33. Jacque, N. *et al.* Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid
438 leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood* **126**, 1346–1356 (2015).
- 439 34. Baran, N. *et al.* Inhibition of mitochondrial complex I reverses NOTCH1-driven metabolic
440 reprogramming in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Commun.* **13**, 2801 (2022).
- 441 35. Wei, A. H. *et al.* Venetoclax Combined With Low-Dose Cytarabine for Previously
442 Untreated Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From a Phase Ib/II Study. *J. Clin.*
443 *Oncol.* **37**, 1277–1284 (2019).
- 444 36. Roberts, A. W. *et al.* Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic
445 Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **374**, 311–322 (2016).
- 446 37. Zappone, E. *et al.* Venetoclax in association with decitabine as effective bridge to
447 transplant in a case of relapsed early T-cell lymphoblastic leukemia. *Clin. Case Rep.* **8**, 2000–2002
448 (2020).
- 449 38. La Starza, R. *et al.* Venetoclax and Bortezomib in Relapsed/Refractory Early T-Cell
450 Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO Precis. Oncol.* **3**, PO.19.00172 (2019).
- 451 39. Richard-Carpentier, G. & DiNardo, C. D. Venetoclax for the treatment of newly diagnosed
452 acute myeloid leukemia in patients who are ineligible for intensive chemotherapy. *Ther. Adv.*
453 *Hematol.* **10**, 2040620719882822 (2019).
- 454 40. El-Cheikh, J. *et al.* Feasibility of the Combination of Venetoclax and Asparaginase-based
455 Chemotherapy for Adult Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia.
456 *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **18**, e441–e444 (2018).
- 457 41. Wan, C.-L. *et al.* Venetoclax combined with azacitidine as an effective and safe salvage

458 regimen for relapsed or refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia: a case series. *Leuk.*
459 *Lymphoma* **62**, 3300–3303 (2021).
460
461

462 **FIGURE AND TABLE LEGENDS**

463

464 **Table Legends:**

465 **Table 1. Clinico-biological and outcome characteristics of adult and pediatric T-ALL**
466 **(GRAALL and FRALLE protocols) according to PI3K pathway alterations status**

467 **Abbreviations:** MRD1 corresponds to MRD evaluation after induction and was performed by
468 allele-specific oligonucleotides polymerase chain reaction. T-cell receptor status and oncogenic
469 were performed as described in supplemental methods. T-ALL: T-cell acute lymphoblastic
470 leukemia; WBC, white blood count; CNS, central nervous system; ETP, early thymic precursor;
471 High Risk classifier, NOTCH1/FBXW7-RAS/ PTEN classifier as previously described¹; CR,
472 complete remission; MRD, minimal residual disease; Allo-HSCT, allogenic hematopoietic stem
473 cell transplantation; CIR, cumulative incidence of relapse; OS, overall survival; HR: hazard ratio,
474 SHR: specific hazard ratio, CI: confidence interval

475

476 **Table 2. Clinico-biological characteristics of 5 R/R T-ALL/LL patients treated with**
477 **Erwinase and Temsirolimus**

478 **Abbreviations:** VPD: Vindesine / PEG-asparaginase/Daunorubicin, MRDNeg: MRD negative,
479 ASCT : allogenic stem cell transplantation, CR : complete response, DLI : donor lymphocyte
480 infusion, T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-LL: T-cell lymphoblastic lymphoma,
481 IMB: immature beta, pre-AB: pre alpha-beta, ETP: early thymic progenitor, Nb : number, ET :
482 Erwinase / Temsirolimus, PTEN^{Mut}: PTEN mutation, PTEN^{Del}: PTEN deletion, PIK3R1^{Mut}:
483 PIK3R1 mutation, WBC: white blood cells, CNS : central nervous system

484

485 **Figure legends**

486

487 **Figure 1. Incidence and prognostic impact of PI3K alterations in 476 adult and pediatric T-**
488 **ALL.**

489 **A:** Overall incidence of PI3KS alterations in our cohort of 476 patients.

490 **B:** Upset plot depicting the co-occurrence of the different PI3K alterations identified among the
491 87 PI3K altered T-ALL patients (left panel) and stacked bar plot revealing the genetic patterns of
492 the mutations (right panel).

493 **C:** Comparison of overall survival (OS) according to PI3K alteration status in our cohort of 476
494 T-ALL patients.

495 **D:** Comparison of event free survival (EFS) according to PI3K alteration status in our cohort of
496 476 T-ALL patients.

497 **E:** Comparison of cumulative incidence of relapse (CIR) according to PI3K alteration status in our
498 cohort of 476 T-ALL patients.

499 **F:** Comparison of the time to reach a detectable leukemic infiltration after injection of primary
500 samples in NSG mice model.

501 **G:** Comparison of the leukemia free survival according to PI3K alteration status in NSG mice.

502

503 **Figure 2. Oncoplot depicting the genetic anomalies observed in *PI3K* Altered vs Wild-type**
504 **T-ALL cases of the GRAALL03/05 and FRALLE2000 studies.** Genes are classified by
505 functional groups. The right panel indicates the overall frequency of alterations per gene

506

507 **Figure 3. Aberrant PI3K signaling polarizes leukemia metabolism towards glycolysis.**

508 **A:** Phosphorylation of Akt (pAkt^{S473}) and subsequent mTOR target S6 (pS6^{T235/236}) and 4E-BP1
509 (p4E-BP1^{T37/46}) were assessed by flow-cytometry in PI3KS^{ALT} and PI3KS^{WT} primary samples of T-
510 ALL patients.

511 **B:** Differential expression analysis performed on a subset of 2,141 expressed metabolic genes in
512 PI3KS^{ALT} vs PI3KS^{WT} T-ALL (n = 160 T-ALL).

513 **C:** Enrichment analyses carried out on differentially expressed metabolic genes in PI3KS^{ALT} T-
514 ALL versus wild-type cases.

515 **D:** Gene set enrichment analysis (GSEA) performed in PI3KS^{ALT} T-ALL versus wild-type cases
516 (n = 160 T-ALL).

517

518 **Figure 4. Metabolic plasticity driven by PI3KS alterations contribute to the survival of**
519 **leukemic blasts in nutrient-deprived environments.**

520 **A:** Evaluation of the glycolytic activity in in PI3KS^{ALT} T-ALL cell line models versus wild-type
521 by measuring the glucose uptake.

522 **B:** Assessment of the sensitivity of PI3KS^{ALT} T-ALL to glucose deprivation.

523 **C:** Evaluation of the glycolytic activity in in PI3KS^{ALT} T-ALL PDX versus wild-type by measuring
524 the glucose uptake.

525 **D:** Correlations observed between the phosphorylation of PI3KS effectors and glucose uptake in
526 both PI3K^{SWT} and PI3K^{SALT} PDX.

527 **E:** Assessment of glucose consumption in the context of PI3K and mTORC1 inhibition by
528 wortmannin and temsirolimus in PI3KS-driven blasts.

529 **F:** Assessment of cytotoxicity in the context of PI3K and mTORC1 inhibition by wortmannin and
530 temsirolimus in PI3KS-driven blasts.

531 **G-H:** Evaluation of the capacity of PI3K^{ALT} blasts to survive glucose limitation.

532 **I:** Measurements of PI3K activation in PI3K^{ALT} blasts, as phosphorylation levels of Akt and
533 S6, under glucose deprivation.

534 **J:** Assessment of ATP levels in blasts under glucose deprivation

535

536 **Figure 5. Glutaminolysis is a metabolic circuitry activated in PI3K^{ALT} blasts upon glucose**
537 **deprivation to support their survival.**

538 **A:** Metabolome profiling of a series of 14 PDX (7 WT, 7 ALT) cultured *ex vivo* in complete
539 medium or without glucose.

540 **B:** Enrichment analyses on the pool of deregulated metabolites upon glucose depletion in PI3K^{WT}
541 (left panel) vs PI3K^{ALT} (right panel).

542 **C:** Network analyses of differentially detected metabolites upon glucose deprivation.

543 **D:** Box plot highlighting the metabolomic modifications induced by glucose deprivation in
544 PI3K^{WT} (blue) vs PI3K^{ALT} (red).

545 **E:** Assessment of glucose uptake in blasts either starved for glucose or glutamine.

546

547 **Figure 6. The unique metabolic plasticity conveyed by PI3K^{ALT} confers a**
548 **vulnerability/synthetic lethality to dual inhibition of glutaminolysis and mTOR pathway.**

549 **A:** Effect of glutaminase inhibition using glutaminase small-molecule inhibitor; CB-839 in
550 PI3K^{WT} (left panel) vs PI3K^{ALT} (right panel) T-ALL blasts in the context of glucose deprivation.

551 **B:** Effect of mTOR inhibition using mTOR inhibitor; temsirolimus in PI3K^{WT} vs PI3K^{ALT} T-
552 ALL blasts in the context of glucose deprivation.

553 **C-D:** Impact of the combinatory treatment (mTOR inhibition and glutaminase inhibition) in
554 PI3KS^{ALT} blasts.

555 **E:** Efficacy of Erwinase alone or combined with temsirolimus in PI3KS^{WT} vs PI3KS^{ALT} blasts

556 **F:** Efficacy of Kidrolase alone or combined with temsirolimus in PI3KS^{WT} vs PI3KS^{ALT} blasts

557 **G:** Assessment of the intracellular (left panel) and the extracellular (right panel) pools of
558 metabolite (asparagine, aspartate, glutamine and glutamate) before and after exposition to
559 Erwinase vs Kidrolase in T-ALL blasts.

560 **H:** Survival curves of mice xenografted with PI3KS WT PDX following treatment with two cycles
561 of five-day-long daily gavage with temsirolimus and/or intravenous injection of ErwinaseTM every
562 two days.

563

564 **Figure 7. Clinical evaluation of Erwinase and temsirolimus association in PI3K-driven T-**
565 **ALL and T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LL) patients.**

566 **A:** Timeline depicting the clinical course of 5 T-ALL/LL patients treated with ET associations

567 **B:** Oncoplot depicting the genetic anomalies observed in the 5 T-ALL/LL patients treated with ET
568 association.

569

570 **Figure 8. Volumetric and metabolic assessments performed in T-LL patients treated with**
571 **Erwinase and Temsirolimus association.**

572

Figure 1

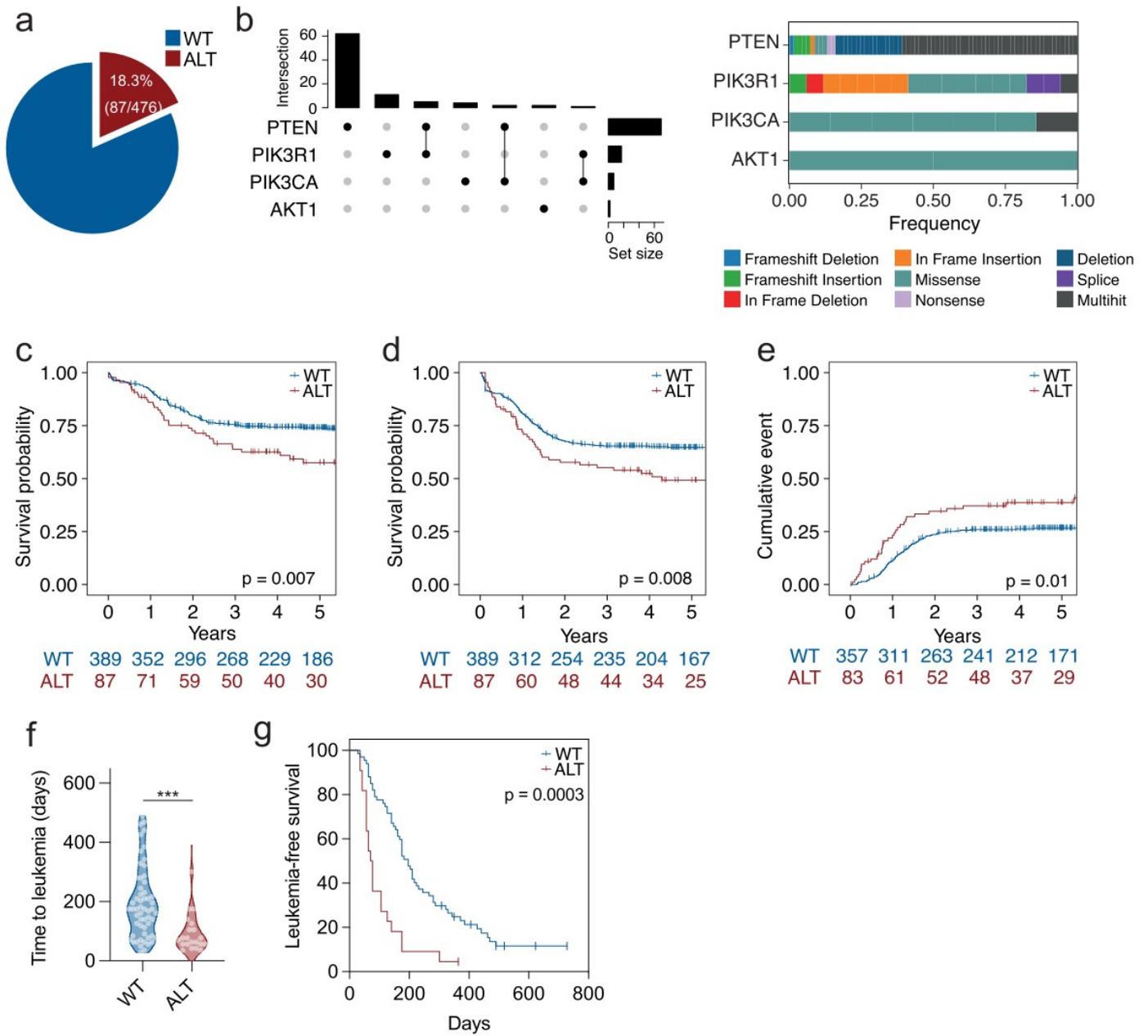


Figure 2

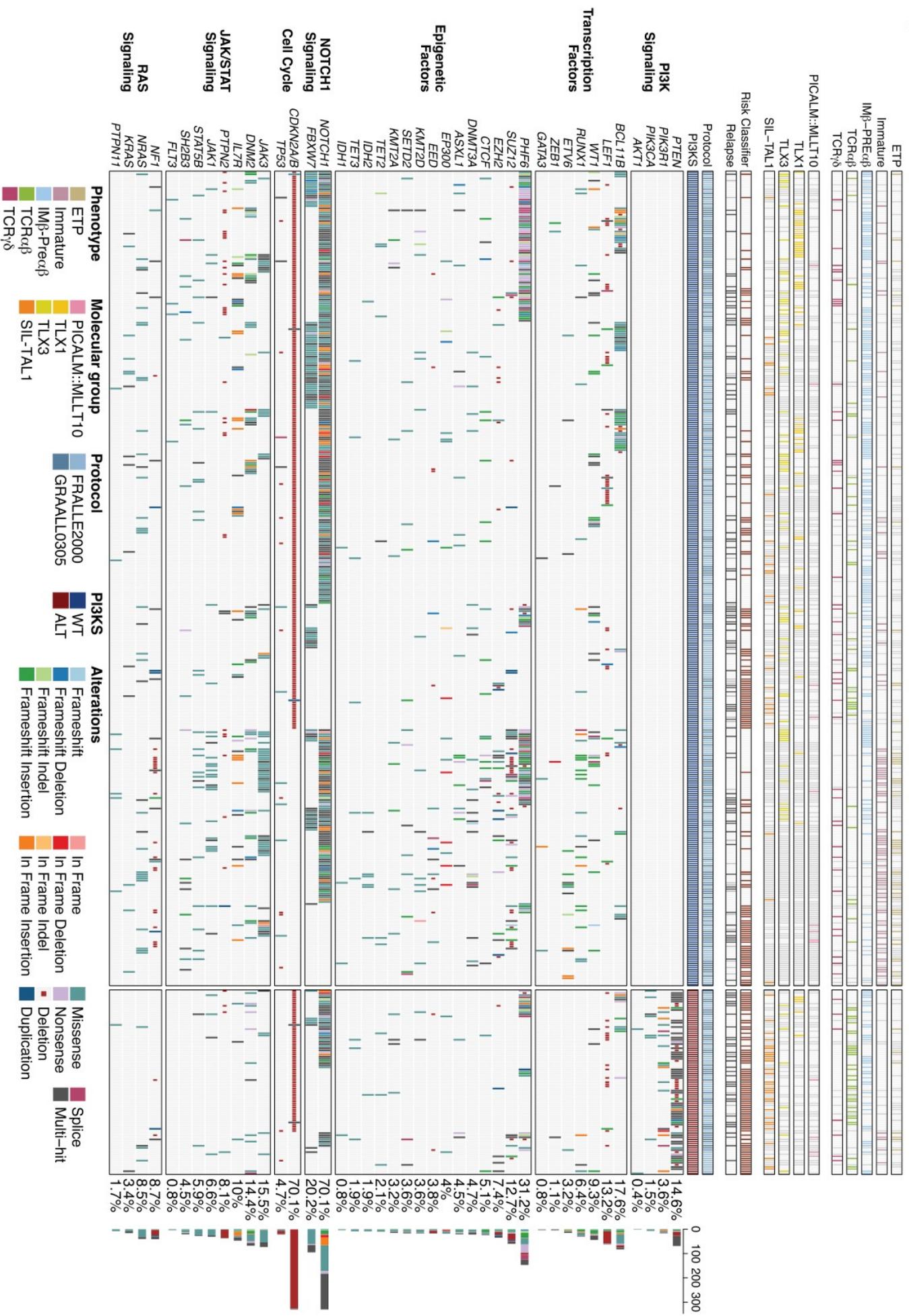


Figure 3

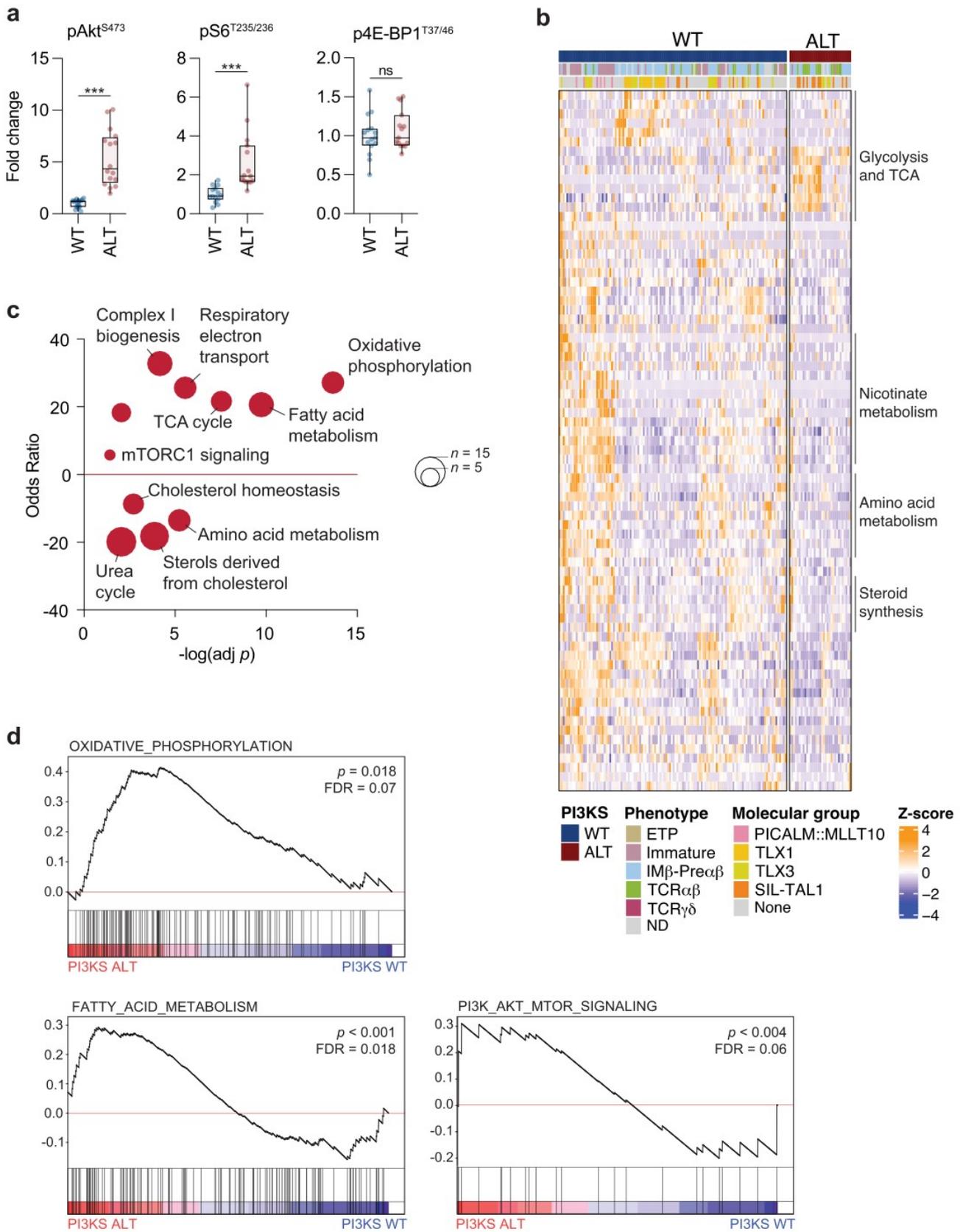


Figure 4

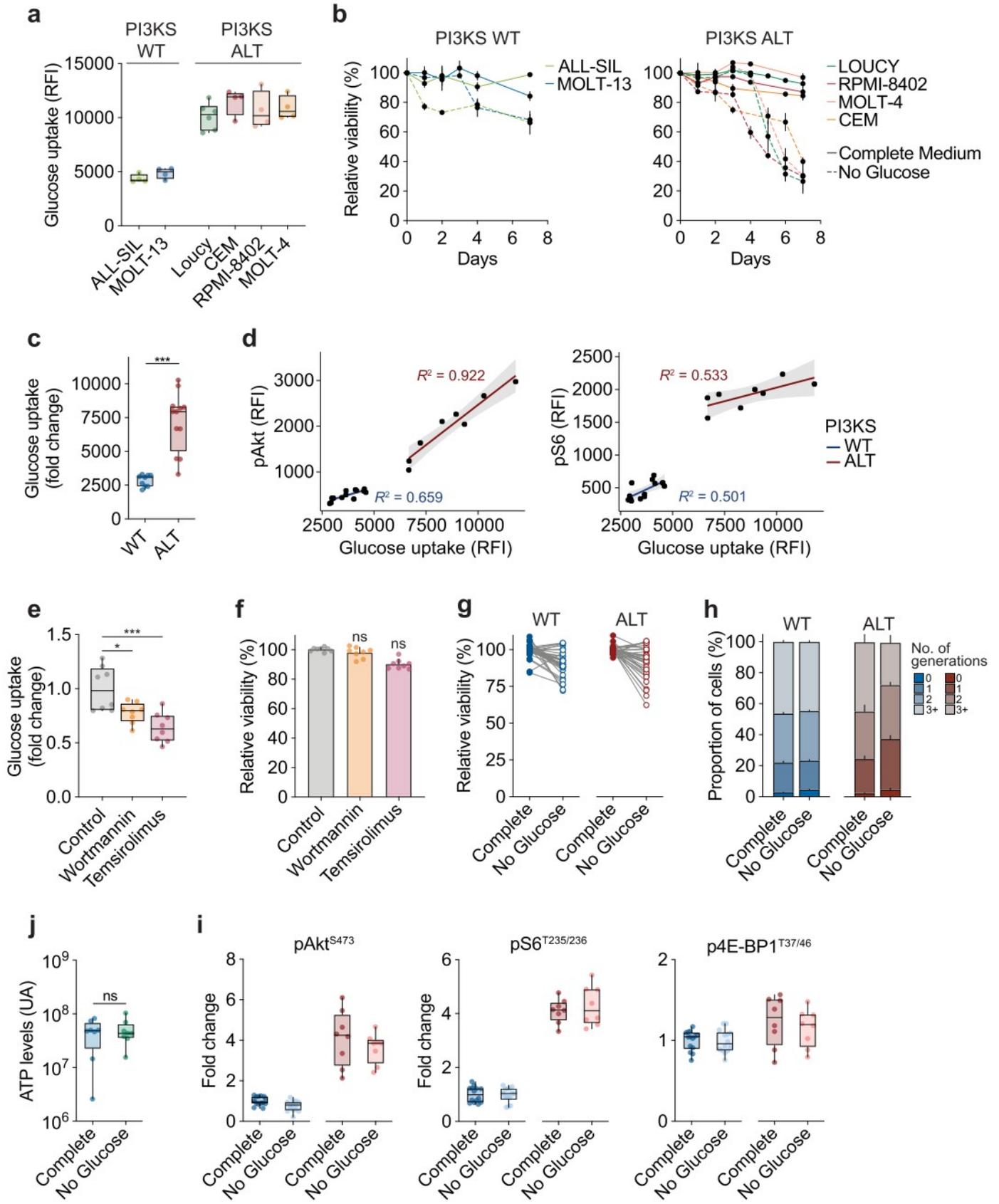


Figure 5

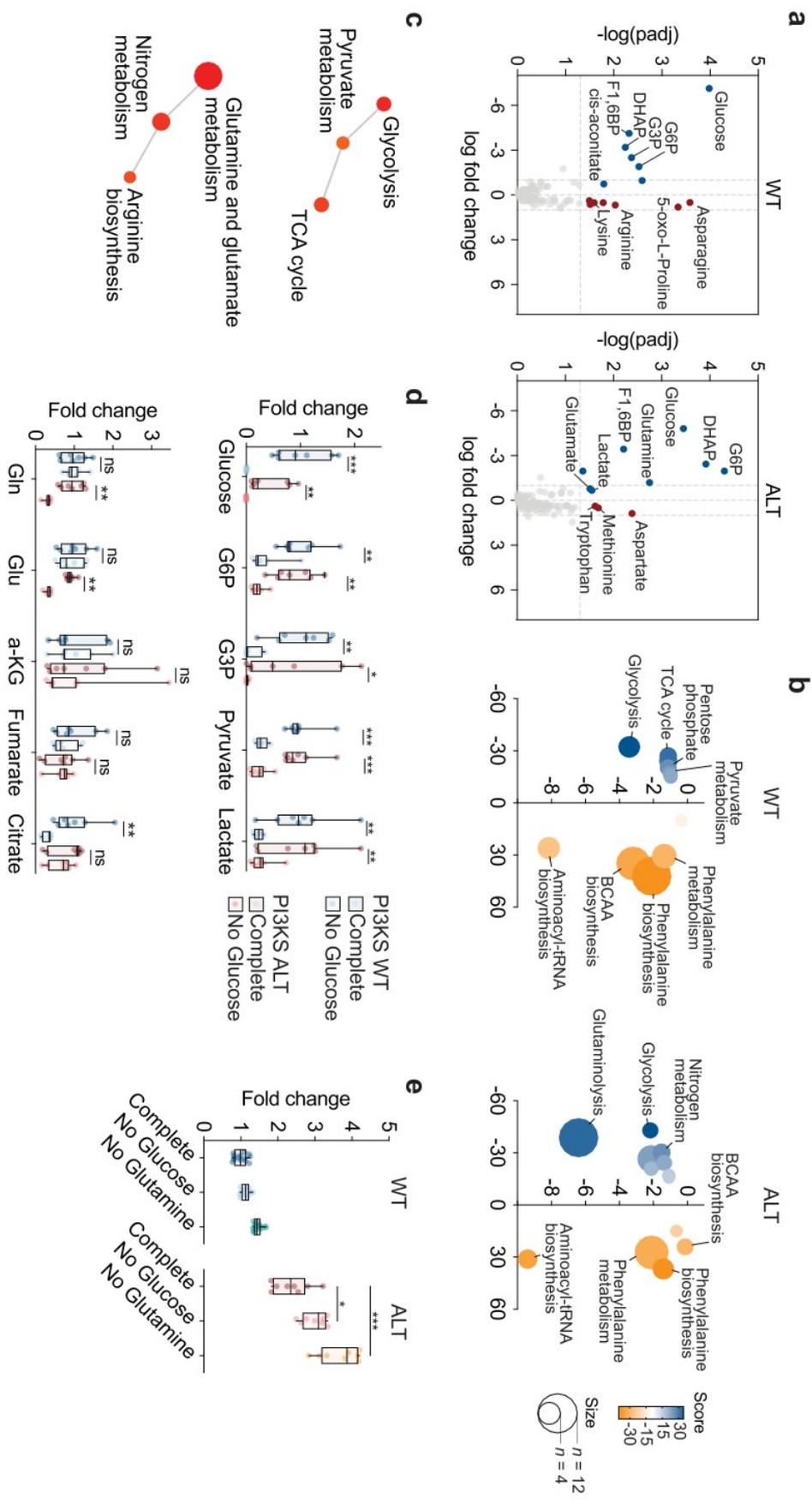
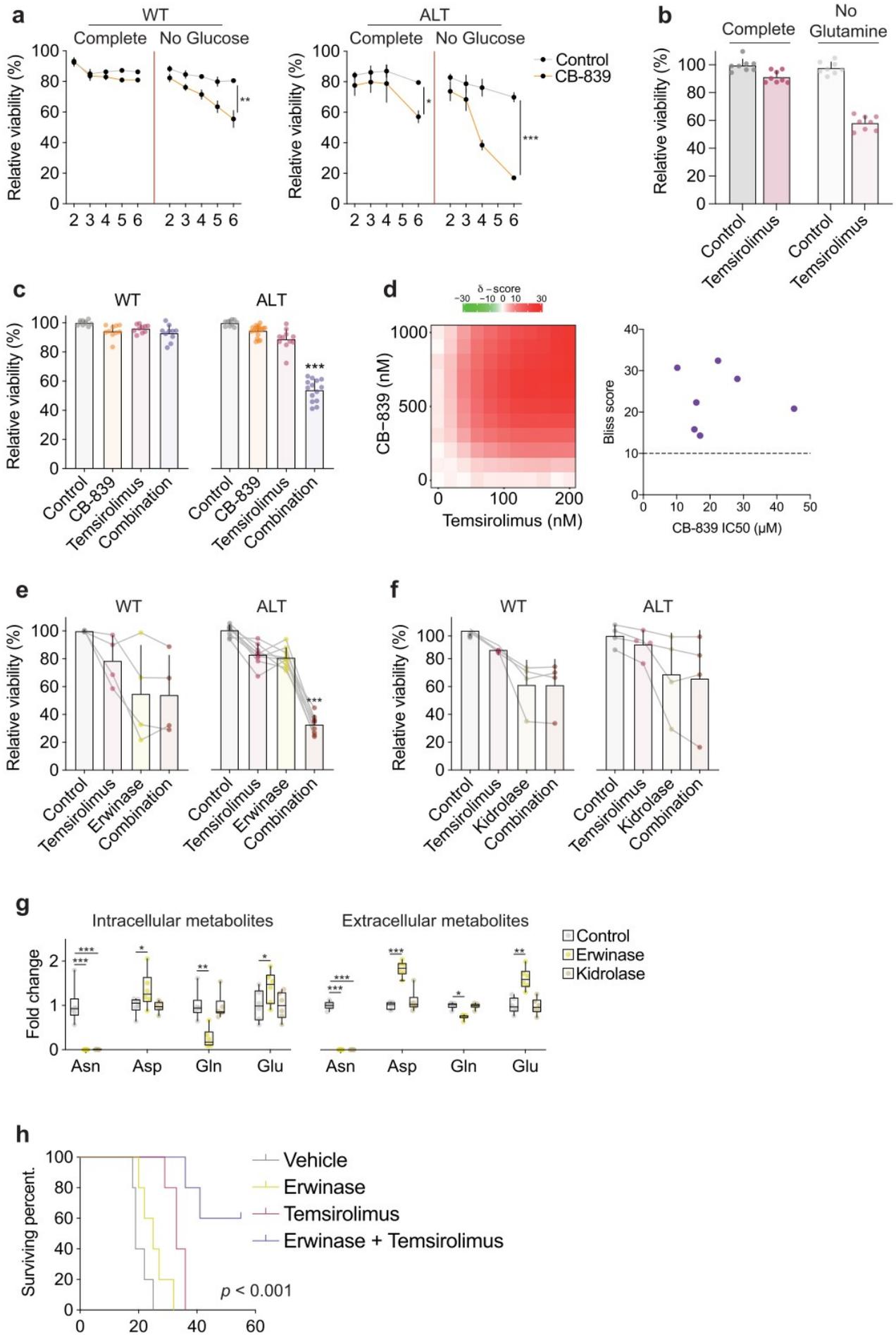


Figure 6



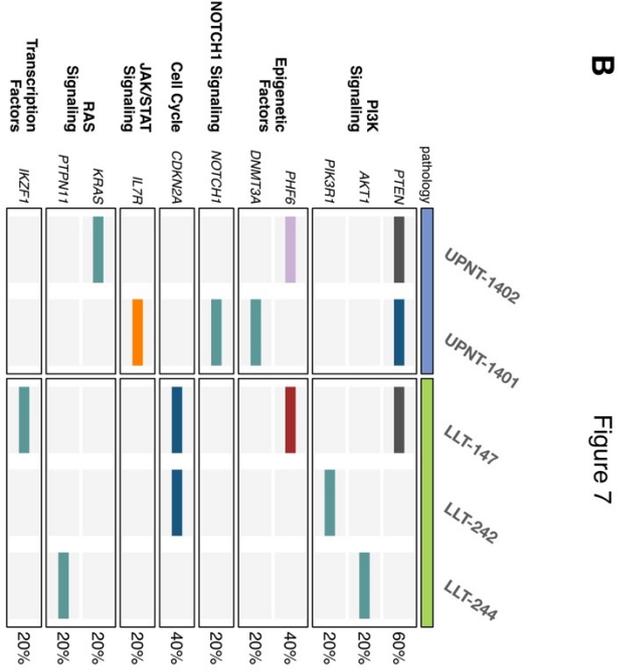
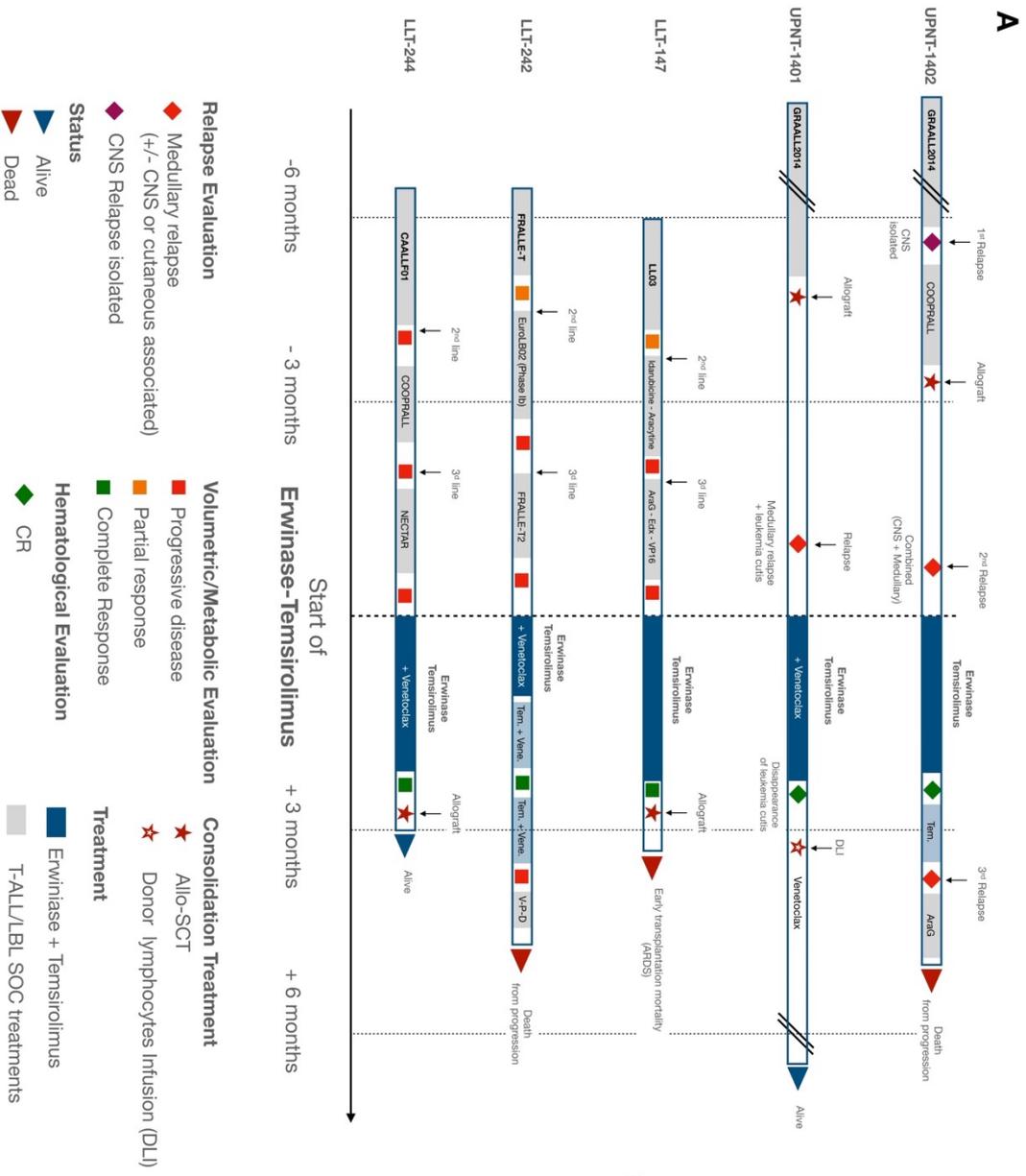
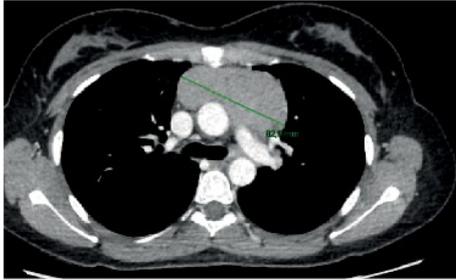
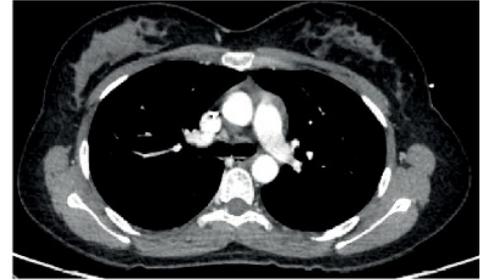


Figure 8

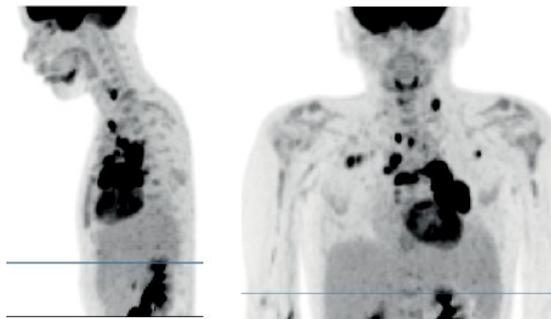
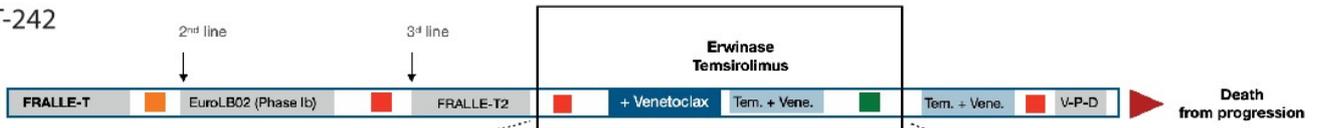
LLT-147



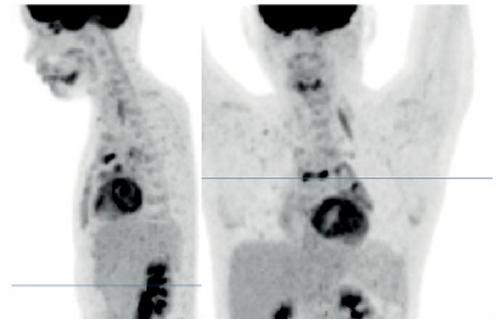
Chest CT evaluation
after 2 cycles of
Erwinase + Tamsirolimus



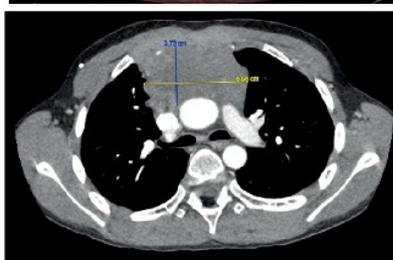
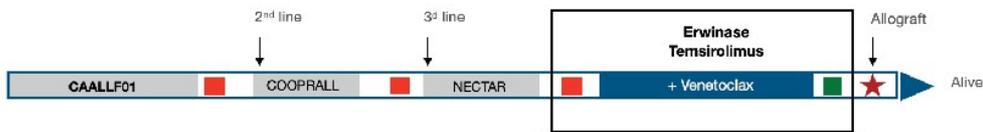
LLT-242



FDG-PET/CT evaluation
after 1 cycle of
Erwinase + Tamsirolimus + Venetoclax
and 1 cycle of
Tamsirolimus + Venetoclax



LLT-244



FDG-PET/CT evaluation
after 2 cycles of
Erwinase + Tamsirolimus + Venetoclax

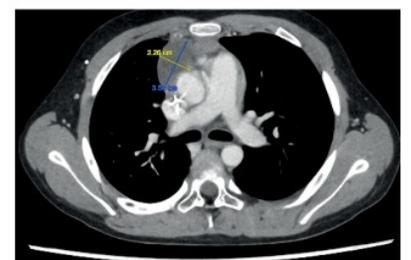


Table 1

	<i>PI3KS^{ALT}</i>	<i>PI3KS^{WT}</i>	Overall	<i>p</i> -value ²
Variable	n = 87 (18%)	n = 389 (82%)	n = 476	
Age (y) ¹	14.6 (3.2-57.2)	15.3 (1.1-59.1)	15.3 (1.1-59.1)	0.21
Male	66 / 87 (76%)	291 / 389 (75%)	357 / 476 (75%)	0.89
Median WBC (G/l) ¹	116 (1-770)	51 (0-980)	64 (0-980)	<0.001
CNS Involvement	14 / 86 (16%)	37 / 388 (10%)	51 / 474 (11%)	0.082
Immunophenotype				<0.001
Immature (IM0/δ/γ)	5 / 75 (7%)	84 / 344 (24%)	89 / 419 (21%)	
IMβ/pre-αβ	33 / 75 (44%)	178 / 344 (52%)	211 / 419 (50%)	
Mature TCRγδ	7 / 75 (9%)	46 / 344 (13%)	53 / 419 (13%)	
Mature TCRαβ	30 / 75 (40%)	36 / 344 (10%)	66 / 419 (16%)	
ETP phenotype	7 / 59 (12%)	49 / 248 (20%)	56 / 307 (18%)	0.19
Oncogenetic classification				<0.001
<i>CALM-AF10</i>	4 / 87 (5%)	9 / 389 (2%)	13 / 476 (3%)	
<i>TLX1</i>	5 / 87 (6%)	49 / 389 (13%)	54 / 476 (11%)	
<i>TLX3</i>	7 / 87 (8%)	65 / 389 (17%)	72 / 476 (15%)	
<i>SIL-TAL1</i>	29 / 87 (33%)	28 / 389 (7%)	57 / 476 (12%)	
Negative	34 / 87 (39%)	185 / 389 (48%)	219 / 476 (46%)	
ND	8 / 87 (9%)	53 / 389 (14%)	61 / 476 (13%)	
Risk Classifier N/F/R/P				
High-risk	72 / 87 (83%)	137 / 389 (35%)	209 / 476 (44%)	<0.001
Treatment Response				
Corticosenitivity	35 / 83 (42%)	224 / 384 (58%)	259 / 467 (55%)	0.010
Chemosensitivity	68 / 85 (80%)	269 / 382 (70%)	337 / 467 (72%)	0.083
Complete Remission	83 / 87 (95%)	357 / 389 (92%)	440 / 476 (92%)	0.37
MRD1 > 10 ⁻⁴	23 / 64 (36%)	100 / 276 (36%)	123 / 340 (36%)	>0.99
Allo-SCT	19 / 84 (23%)	82 / 372 (22%)	101 / 456 (22%)	0.89
Outcome				
5-year CIR, SHR [95% CI]	39% [27;49]	27% [22;31]	29% [25;33]	0.01
5-year OS, HR [95% CI]	58% [47;70]	74% [70;79]	71% [67;75]	0.007

¹Statistics presented: Median (Minimum-Maximum)

²Statistical tests performed: Fisher's exact test; Wilcoxon rank-sum test.

p-values < 0.05 are indicated in bold

MRD1 corresponds to MRD evaluation after induction and was performed by allele-specific oligonucleotides polymerase chain reaction. T-cell receptor status and oncogenic were performed as described in supplemental methods.

T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood count; CNS, central nervous system; ETP, early thymic precursor; High Risk classifier, *NOTCH1/FBXW7-RAS/PTEN* classifier as previously described¹; CR, complete remission; MRD, minimal residual disease; Allo-HSCT, allogenic hematopoietic stem cell transplantation; CIR, cumulative incidence of relapse; OS, overall survival; HR: hazard ratio, SHR: specific hazard ratio, CI: confidence interval

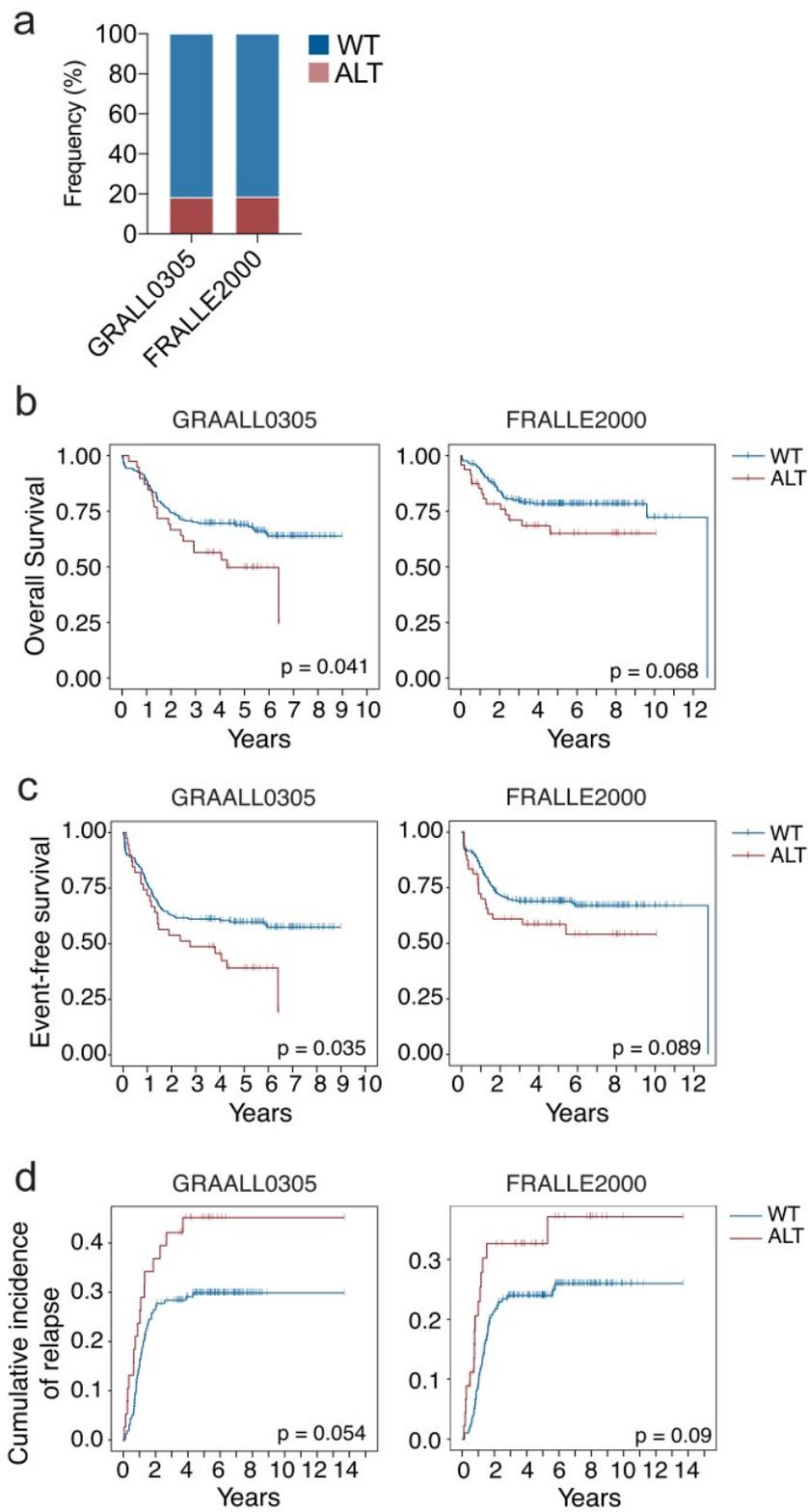
1. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(34):4333–4342.

Table 2. Characteristics of R/R T-ALL/LL patients treated with Erwinase/Temsirolimus

<i>Patient</i>	UPNT-1402	UPNT-1401	T-LL-147	T-LL-242	T-LL-244
Clinical characteristics					
Age at diagnosis	45 y	50 y	26 y	17 y	8 y
Sex	M	F	F	M	M
Disease characteristics					
T-ALL/LL	T-ALL	T-ALL	T-LL	T-LL	T-LL
Oncogenetics	<i>NA</i>	NEG	NEG	NEG	NEG
Immunophenotype	<i>NA</i>	IMB	pre-AB	<i>NA</i>	<i>NA</i>
ETP-ALL	0	1	0	0	0
WBC at diagnosis	290	353	-	-	-
CNS involvement	0	0	<i>NA</i>	1	0
PI3K alteration	<i>PTEN^{Mut+Del}</i>	<i>PTEN^{Del}</i>	<i>PTEN^{Mut+Del}</i>	<i>PIK3R1^{Mut}</i>	<i>AKT1^{Mut}</i>
Prior treatment history					
Nb of prior lines of therapy	2	1	3	3	3
Allograft prior ET	yes	yes	no	no	no
Erwinase-Temsirolimus (ET)					
Nb of cycles of ET	2	2	2	1	2
Association with Venetoclax	0	1	0	1	1
Response evaluation to ET	MRD ^{Neg}	MRD ^{Neg}	Volumetric CR	Volumetric CR	Volumetric and Metabolic CR
Toxicity	Grade 3/4	Grade 2/3	Grade 1/2	Grade 1/2	Grade 1/2
Reason for ET discontinuation	Toxicity	Consolidation (DLI)	Consolidation (ASCT)	Supply restriction of Erwinase	Consolidation (ASCT)
Treatments following ET	Temsirolimus	DLI + Venetoclax	ASCT	Temsirolimus + Venetoclax	ASCT
Evolution					
Disease evolution after ET discontinuation	T-ALL Relapse	Persistent CR	ARDS post-ASCT	T-LL Progression	Persistent CR
Salvage treatment	Nelarabine	-	-	VPD	
Status	Died from disease progression	Alive (4y after DLI)	Died from ASCT related-toxicity	Died from disease progression	Alive (2 months post ASCT)

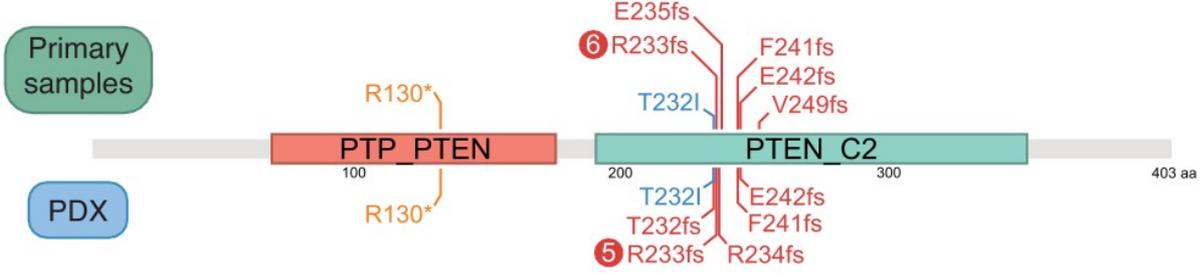
Abbreviations : VPD: Vindesine / PEG-asparaginase/Daunorubicin, MRD^{Neg}: MRD negative, ASCT : allogenic stem cell transplantation, CR : complete response, DLI : donor lymphocyte infusion, T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-LL: T-cell lymphoblastic lymphoma, IMB: immature beta, pre-AB: pre alpha-beta, ETP: early thymic progenitor, Nb : number, ET : Erwinase / Temsirolimus, *PTEN^{Mut}*: PTEN mutation, *PTEN^{Del}*: PTEN deletion, *PIK3R1^{Mut}*: PIK3R1 mutation, WBC: white blood cells, CNS : central nervous system

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

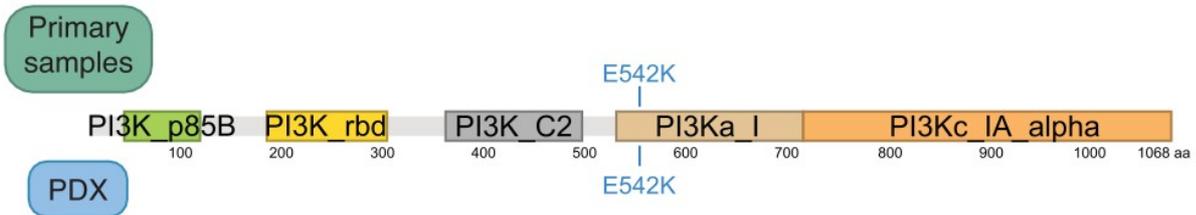
PTEN



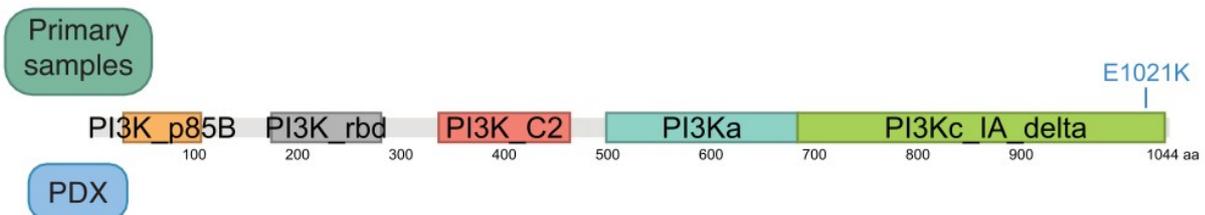
PIK3R1



PIK3CA



PIK3CD



Article 6. Cibler les LAL-T *NOTCH1*/*FBXW7*^{WT}

Dans ce travail (en cours de préparation) nous avons cherché à expliquer un paradoxe que nous avons mis en évidence au cours d'une première étude en 2009 et qui a été ensuite confirmé à plusieurs reprises depuis. Il s'agit du pronostic favorable associé aux mutations de *NOTCH1* dans les LAL-T. *NOTCH1* est un oncogène majeur dans les LAL-T (plus de 70% d'entre elles présentent des mutations activatrices de *NOTCH1*) et pourtant nous avons précédemment rapporté que la présence de mutations de *NOTCH1* était un facteur de bon pronostic (à la fois dans les LAL-T adultes et pédiatrique, mais également dans les LBL-T adultes et pédiatriques).

Ce travail s'appuie également sur le concept de cellules initiatrices de leucémie ou LIC. Les LIC ont une place centrale dans l'oncogenèse des LAL-T, on admet aujourd'hui que ce contingent minoritaire au sein des contingents blastiques ou bulk leucémique, présente en outre une chimiorésistance accrue et sa persistance post-chimiothérapie conduirait à la rechute des LAL-T.

Dans la première partie de ce travail nous nous sommes appuyés sur des analyses en single-cell RNA-seq d'échantillons primaires de LAL-T afin d'identifier les LIC dans les contingents blastiques de LAL-T *N/F*^{MUT} (n = 7) et LAL-T *N/F*^{WT} (n= 6) en confrontant leurs signatures transcriptomiques aux différentes signatures de LIC rapportées dans les hémopathies malignes.

De façon attendue et en lien avec le rôle de *NOTCH1* dans la régulation positive du maintien des LIC dans les LAL-T nous avons retrouvé une proportion de LIC plus importante dans le contingent des LAL-T *N/F*^{MUT}. En revanche, après avoir isolé ces LIC au sein des bulk blastiques, l'analyse comparative de leurs signatures transcriptomiques respectives a révélé que les LIC de LAL-T *N/F*^{MUT} présentaient un enrichissement en gènes impliqués dans la régulation positive du cycle cellulaire avec notamment une signature Myc prédominante, alors qu'au contraire les LIC de LAL-T *N/F*^{WT} présentaient une signature de type quiescence. Ce résultat conforte l'hypothèse de LIC maintenues en état pro-prolifératif dans un contexte *N/F*^{Mut} et à l'inverse des LIC maintenus en état de quiescence dans les LAL-T *N/F*^{WT}, les rendant de fait plus résistantes à l'activité cytotoxique des chimiothérapies dont l'activité est tributaire de l'état de prolifération de la cellule tumorale.

Afin de caractériser d'un point de vue fonctionnel l'impact de l'activation NOTCH1 sur la population de LIC et donc sur le risque de rechute post chimiothérapie (CT), nous avons utilisé des modèles de souris humanisées de LAL-T N/F^{MUT} (n = 7) et N/F^{WT} (n = 7). Grâce à des approches de dilution de traceur intra-cellulaire, nous avons identifié un contingent de cellules peu prolifératives aux caractéristiques proches des LIC dans ces modèles. En dehors de toute pression de CT nous retrouvons un taux de LIC comparable entre les LAL-T N/F^{MUT} et N/F^{WT} , en revanche et de façon particulièrement intéressante, après exposition à un cycle de CT ayant permis de réduire massivement l'infiltration blastique, nous retrouvons un enrichissement significatif en LIC dans les LAL-T N/F^{WT} comparativement aux LAL-T N/F^{MUT} .

Afin de préciser le rôle de l'activation de la voie NOTCH1 dans la modulation de l'état de quiescence/prolifération des LIC et leur sélection sous pression de la CT nous avons créé un modèle d'expression transgénique d'une protéine NOTCH1^{Mut} en utilisant une approche par CRISPR/Cas9 pour induire une mutation de type PEST ($N/F^{CRISPR-PEST}$), conduisant à perturber l'interaction de NOTCH1 avec son E3 ligase FBXW7, à partir d'un échantillon de LAL-T N/F^{WT} . Nous avons dans un premier temps confirmé que l'activation de NOTCH1 s'accompagnait d'une réduction significative du taux de LIC après exposition à la CT comparativement au modèle parental N/F^{GL} . Ensuite, par une approche en single-cell RNA-seq nous avons montré que la proportion de LIC quiescentes étaient augmentées dans les LAL-T N/F^{WT} après exposition à la chimiothérapie (CT). A l'inverse, dans les LAL-T $N/F^{CRISPR-PEST}$, l'activation de NOTCH1 et la régulation positive de c-MYC associée augmentait la proportion de LIC en phase proliférative induisant une augmentation de leur chimiosensibilité.

Au total dans ce travail, nous avons cherché à démontrer que l'activation de NOTCH1, en modulant l'état de quiescence/prolifération des LIC permet d'augmenter leur chimiosensibilité conduisant à ainsi une réduction du risque de rechute grâce à l'éradication des LIC au cours des phases de chimiothérapies successives. A l'inverse, dans les LAL-T N/F^{WT} , l'absence d'activation de NOTCH1 conduirait à maintenir les LIC en phase de quiescence, les rendant ainsi chimiorésistantes ce qui se traduirait à terme par leur persistance post-CT et *in fine* à conduire à la rechute.

Nous proposons donc une approche en rupture avec les essais cliniques actuelles, qui consisterait à cibler les LAL-T N/F^{WT} en cherchant à activer la voie NOTCH1 au moment de l'initiation de la CT afin de mettre les LIC N/F^{WT} en cycle et ainsi favoriser leur éradication par la CT cycle-dépendante et diminuer à terme le risque de rechute.

Article VI

Titre :

Notching up leukemia-initiating cells to eradicate T-ALL

Co-auteurs :

Mathieu Simonin*, Guillaume P. Andrieu*, Guillaume Hypolite, Mehdi Latiri, Mélanie Féroul, Annabelle Tymen, Patrick Villarèse, Françoise Huguet, Hervé Dombret, Nicolas Boissel, Vahid Asnafi.

*co-premier auteur

État de article :

En cours de préparation pour soumission.

Nom de la revue :

-

Année de Publication :

-

1 **Notching up leukemia-initiating cells to eradicate T-ALL**

2
3 Mathieu Simonin*^{1,2,3}, Guillaume P. Andrieu*^{1,2}, Guillaume Hypolite^{1,2}, Mehdi Latiri^{1,2}, Mélanie
4 Féroul^{1,2}, Annabelle Tymen^{1,2}, Patrick Villarèse^{1,2}, Françoise Huguet, Hervé Dombret, Nicolas
5 Boissel¹⁷, Vahid Asnafi^{1,2§}

7 **Affiliations**

8 ¹ Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital
9 Necker Enfants-Malades, Université de Paris, Paris, France

10 ² Institut Necker-Enfants Malades (INEM), Institut national de la santé et de la recherche
11 médicale (Inserm) U1151

12 ³ Department of Pediatric Hematology and Oncology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
13 (AP-HP), Armand Trousseau Hospital, Sorbonne Université, Paris, France

14 ⁴ Université de Paris, Institut Cochin, CNRS UMR8104, INSERM U1016, Paris, France,
15 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Centre-Université de Paris, Service d'Hématologie
16 clinique, Hôpital Cochin

17 ⁵ Hospices Civils de Lyon, Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Lyon-Sud,
18 Pierre-Bénite, France

19 ⁶ CHU UCL Namur – Godinne, service d'Hématologie, Yvoir, Belgique

20 ⁷ Laboratory of Hematology, CHRU Lille, Lille, France and U1172, INSERM, LILLE, France

21 ⁸ Hematology Laboratory and EA3518, University Hospital Saint-Louis, Université de Paris,
22 Paris, France

23 ⁹ Department of Hematology, CHRU - Institut Universitaire de Cancer Toulouse - Oncopole,
24 Toulouse, France

25 ¹⁰ Division of Hematology, Department of Oncology, University Hospital of Geneva and
26 Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland

27 ¹¹ Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK), Bern, Switzerland

28 ¹² Hematology Biology, Nantes University Hospital & CRCINA, Nantes, France

29 ¹³ Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital of Rennes, France

30 ¹⁴ Hemato-Oncology Unit, Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay, France ; Université
31 Versailles Saint Quentin en Yvelines, UMR1184 Université Paris-Saclay, Communauté Paris-
32 Saclay, France

33 ¹⁵ Department of Pediatric Hematology and Immunology, Assistance Publique-Hôpitaux de
34 Paris (AP-HP), Robert Debré Hospital, University Paris Diderot, Paris, France

35 ¹⁶ Department of Hematology, Inserm U1163, IMAGINE Institute, Paris University, Necker
36 Hospital, Paris, France

37 ¹⁷ Université Paris Diderot, Institut Universitaire d'Hématologie, EA-3518, Assistance
38 Publique-Hôpitaux de Paris, University Hospital Saint-Louis, Paris, France.

39
40 *co-first authors

41 §Corresponding author

42 **Keywords:** *NOTCH1*, *T-ALL*, *LIC*, *MYC*

43

44 **Corresponding author:**

45 Vahid Asnafi, Laboratory of Onco-Hematology, Necker-Enfants Malades Hospital, 149 rue de
46 Sèvres, 75015 Paris, France. E-mail: vahid.asnafi@aphp.fr; Phone: +33.144.49.49.14

47

48 **Competing financial interests**

49 The authors declare no competing financial interests.

50 **Word count (excluding references):**

51 **Abstract:** 135 words

52 **Main text:** 3797 words

53

54 **Number of Figures/Tables:** 6 Figures

55 **Number of references:** 30

56

57

58 **ABSTRACT**

59 T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a class of aggressive hematological
60 malignancies associated with poor clinical outcomes in particular in case of relapse disease.
61 Given their characteristics of self-renewal and dormancy, leukemia-inducing stem cells (LIC)
62 have been proposed to play a pivotal role in resistance to antiproliferative chemotherapy and
63 the emergence of relapse. We propose that the oncogenic cooperation of NOTCH1 and c-MYC
64 control the T-ALL LIC population and their sensitivity to chemotherapy. Our results indicate
65 that LIC chemosensitivity is dictated by their *NOTCH1* mutational status. Hence, conventional
66 therapy may select quiescent resisting LIC that will drive an early and deadly relapse. We
67 propose an innovative integrative approach combining cutting-edge single-cell transcriptomics
68 to better identify LICs in T-ALL and their properties. We unravel the molecular mechanisms
69 governing LIC identity and generation under the NOTCH1/c-MYC cooperation.

70

71

72 **INTRODUCTION**

73 Aggressive tumors such as acute leukemia burst within days from the expansion of rapidly
74 proliferating cancer cells. While the tumor bulk is mostly composed of cells with elevated but
75 finite replicative potential, it is consensually accepted that rare malignant populations retain
76 self-renewal capacities and sustain durable cancer progression by the continuous generation of
77 differentiated cells.¹ Leukemias have long served as a model to study these populations capable
78 of clonally reconstituting the parent tumor and coined as leukemia-initiating cells (LIC) in
79 reference to the cancer stem cell paradigm.^{2,3} Given their stem-like properties, LIC remain
80 essentially quiescent within the tumor bulk, hindering their targeting by antiproliferative
81 chemotherapy strategies and represent a major driver of disease resurgence.

82

83 T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a class of aggressive hematological cancers
84 arising from the transformation of thymic cell precursors arrested at specific stages of their
85 differentiation.⁴ Conventional chemotherapy consists of high-dose multi-agent chemotherapy
86 protocols, potentially followed by hematopoietic stem cell (HSC) transplantation. The outcome
87 of pediatric and adult T-ALL has globally improved with modern poly-chemotherapy, yet T-
88 ALL remains of poor prognosis, notably for relapsing cases.⁵ About 25% pediatric and 50%
89 adult T-ALL patients relapse, after a transient initial response, with a dismal 5-year overall
90 survival. This relapse is particularly clinically challenging as it associates with secondary
91 resistance and conveys a dismal prognosis despite salvage chemotherapy. As a result, patients
92 who failed to obtain a durable complete remission rapidly die of disease progression.^{6,7} Hence,
93 it is urgent to better understand the mechanisms driving treatment failure and relapse to
94 improve the rates of durable complete remission to improve the poor prognosis of relapsed
95 cases.

96

97 A critical obstacle to this aim is the heterogeneous cellular and molecular nature of the disease,
98 which is driven by a complex interplay of multiple oncogenic events, such as those leading to
99 the aberrant activation of the NOTCH1 receptor.⁸ This transmembrane glycoprotein, which acts
100 as a transcription factor upon ligand-induced proteolysis, is a master regulator of early T-cell
101 fate specification and thymocyte development.⁹ Gain-of-function mutations of the NOTCH1
102 receptor are observed in about 60% of T-ALL cases and elicit oncogenic NOTCH1 signaling
103 in either a ligand-dependent or independent manner.⁹ Additionally, 8-30% of T-ALL cases
104 present aberrant NOTCH1 signaling results from mutations in the *FBXW7* gene, which encodes
105 a ubiquitin ligase controlling the degradation of the intracellular, transcriptionally active
106 NOTCH1 domain.¹⁰ Among the primary oncogenic effects driven by NOTCH1 activation is
107 the up-regulation of the oncogene c-MYC, which is also a key target of FBXW7-mediated
108 ubiquitination.^{11,12} c-MYC is a master regulator of cellular metabolism (reviewed here¹³) and
109 thus may regulate the proliferative capacities of tumor bulk cells and LIC by controlling energy
110 availability.¹³ Therefore, NOTCH1 and c-MYC compose a major oncogenic node driving T-
111 ALL development and progression.

112

113 We previously established that *NOTCH1*, *FBXW7*, *RAS*, and *PTEN* mutational status define an
114 oncogenic classifier stratifying T-ALL patients with a low or high relapse risk.^{14,15} Notably, the
115 presence of *NOTCH1/FBXW7* alterations (N/F^{Alt}) associate with low relapse risk. The
116 mechanisms underlying the paradox linking pro-proliferative activation of the NOTCH1
117 pathway and chemosensitivity remain obscure. We hypothesized that the elevated relapse rate
118 observed in N/F wild-type (N/F^{WT}) T-ALL is related to the treatment-induced selection of rare
119 LIC that, in the absence of NOTCH1 aberrant activation, are quiescent and escape cell cycle-
120 targeting drugs. Conversely, NOTCH1 oncogenic activation may elicit cell proliferation,
121 notably through c-MYC upregulation, thus sensitizing to chemotherapy.

122

123 We postulate that the balance of NOTCH1 and c-MYC signaling controls the T-ALL LIC
124 identity via transcriptomic and epigenetic modulation. We seek to validate that this oncogenic
125 cooperation is targetable in order to overcome T-ALL chemoresistance and relapse. We
126 hypothesize that the high relapse rate observed in N/F^{WT} T-ALL is related to the treatment-
127 induced selection of rare blasts that, in the absence of NOTCH1 aberrant activation, are
128 quiescent and escape cell cycle drugs toxic action. Conversely, NOTCH1 oncogenic activation
129 could facilitate, e.g., via c-MYC up-regulation, cell cycling conferring sensitivity to
130 chemotherapy.

131

132

133 RESULTS

134 Comparative analysis of the modality of T-ALL relapse suspects different mechanisms 135 related to *NOTCH1/FBXW7* mutational status

136 We analyzed the incidence and the modality of relapse in 476 T-ALL, including 354 (74%)
137 N/F^{ALT} T-ALL and 122 (26%) N/F^{WT} T-ALL. In the entire cohort, 127 patients suffered from
138 T-ALL relapses (27%). As expected, N/F^{WT} T-ALL were associated with a higher rate of
139 relapse; 39/122 (32%) vs 88/354 (25%), $p = 0.03$, and a higher cumulative incidence of relapse
140 (CIR) at 5 years (**Figure 1A**). Interestingly, not only relapses of N/F^{WT} T-ALL were more
141 frequent but also occurred earlier than N/F^{ALT} T-ALL (**Figure 1B**). Based on the timeline of
142 ALL treatment, relapses were categorized into 3 groups: very early relapse (<8 months from
143 diagnosis and before maintenance therapy; 29/127; 23% of the entire cohort), early relapses (8-
144 36 months, during maintenance 92/127; 72%), and late relapses (>36 months, after completion
145 of the therapy, 6/127; 5%). Importantly, the delay of relapse differs between N/F^{WT} and N/F^{ALT}
146 T-ALL (**Figure 1C**). Thus, N/F^{WT} T-ALL were associated with a significantly higher incidence
147 of very early relapse 17/39 (44%) compared to N/F^{ALT} T-ALL: 12/88 (14%), $p < 0.001$ (**Figure**
148 **1D and 1E**). Of note, no late relapse was observed among the N/F^{WT} T-ALL. Taken together,
149 these results suggest the existence of preexisting resistant subclones in N/F^{WT} T-ALL compared
150 to N/F^{ALT} T-ALL, leading to very early relapses in N/F^{WT} T-ALL. The LIC in N/F^{WT} T-ALL
151 could represent these preexisting resistant subclones. These cells maintained in a quiescent
152 state associated with innate chemoresistance could repopulate a tumor bulk upon treatment
153 pressure cessation between each cycle of chemotherapy, leading to relapse. Conversely, in
154 N/F^{Mut} T-ALL the majority of relapses occurred after the first most intensives phases of
155 chemotherapy through a 2-step process well previously described^{16,17}, in which a persister clone
156 survives initial chemotherapy and acquires resistance mutations during treatment leading to
157 relapses.

158

159 **T-ALL LIC identification by single-cell transcriptomics**

160 The lack of markers to identify T-ALL LIC is a critical obstacle to their therapeutic eradication
161 and relapse prevention. Several studies have coined different LIC populations defined by label
162 retention or reduced gene set expression but no consensual identifier has been proposed yet.^{11,18}

163 Hence, it is possible that in T-ALL, multiple cell populations with LIC properties co-exist.

164 To identify LIC within the tumor bulk of primary T-ALL, we analyzed a series of 13 primary
165 T-ALL samples (7 N/F^{WT}, 6 N/F^{ALT}) by single-cell RNA sequencing (scRNAseq) totalizing
166 43,744 cells and identified clusters of cells with transcriptomic LIC identity as defined by a
167 consensus signature (see Methods) (**Figure 2a and 2b**).¹⁸⁻²¹

168 The majority of these LIC originated from N/F^{ALT} samples (**Figure 2c**), suggesting that N/F^{ALT}
169 T-ALL may contain more LIC than their WT counterparts. To solve this question, we
170 interrogated how N/F^{ALT} and N/F^{WT} differ transcriptionally. Interestingly, we found that N/F^{ALT}
171 T-ALL LIC presented signatures of NOTCH1/MYC-driven proliferative cells, whereas LIC
172 from N/F^{WT} T-ALL were transcriptionally defined as quiescent (**Figure 2d and 2e, Figure 3a,**
173 **3b and 3c**). Critically, these data reinforce the concept that N/F^{ALT} T-ALL contain more LIC
174 with proliferative features that may confer chemosensitivity, while quiescent N/F^{WT} LIC may
175 be selected by therapy and lead to higher relapse rates. These results suggest that the N/F
176 mutational status directly shapes the LIC pool in T-ALL.

177

178 **Identification of T-ALL LIC in PDX models**

179 We next sought to model the impact of NOTCH1 oncogenic activation on the LIC population
180 and relapse risk and decipher the underlying mechanisms in a humanized model of T-ALL to
181 functionally assess these hypotheses. We first determined the proportion of LIC in our
182 collection of T-ALL patient-derived xenografts (PDX) using a label retention-based strategy.¹⁸

183 Prior to xenografting, T-ALL blasts were stained with a dye tracing cell division. Cells with
184 low/no proliferation rate retain the dye and are described as LIC.¹⁸ As reported in other forms
185 of ALL, we identified a rare population of label-retaining cells (LRC) in N/F^{WT} T-ALL
186 (**Figures 4A and 4B**). As expected, the proportion of LRC was comparable between N/F^{WT} T-
187 ALL and N/F^{ALT} T-ALL (**Figure 4C**). While non-LRC bulk blasts exhibited a highly
188 proliferative profile, we confirmed the quiescent phenotype of LRC by Ki67 staining (**Figure**
189 **4D**). We postulated that LRC quiescence confers chemoresistance. To assess this *in vivo*, we
190 treated 14 PDX (7 N/F^{WT}, 7 N/F^{ALT}) with a conventional chemotherapy combination of
191 vincristine/dexamethasone (VD) for 5 days (1 injection of vincristine followed by 4 injections
192 of dexamethasone) and measured the proportion of LRC. While chemotherapy efficiently
193 reduced the leukemic burden in both groups, the percentage of LRC post-treatment was
194 significantly higher in N/F^{WT} PDX (**Figure 4E**), suggesting that these N/F^{WT} T-ALL cases
195 contain more dormant, refractory LRC that are selected by chemotherapy and could lead to
196 higher relapse risk.

197

198 **NOTCH1 activation signaling reshape LIC populations**

199 Our results suggest that the N/F mutational status directly shape the LIC pool in T-ALL. To
200 prove this, we engineered primary samples and PDX to mimic the impact of NOTCH1
201 mutations on LIC population and relapse risk. Using a CRISPR-based approach, we introduced
202 NOTCH1 PEST domain mutations responsible for FBXW7-mediated NOTCH1 signaling
203 termination in T-ALL N/F^{WT} PDX-derived blasts (**Figure 5a**).⁸ This NOTCH1 mutant form
204 functionally mimics the main genetic abnormalities driving NOTCH1 activation in T-ALL
205 patients as they induce the constitutive activation of NOTCH1 signaling in a ligand-dependent
206 (NOTCH1- Δ PEST) manner (**Figure 5b**). The control and NOTCH1-engineered blasts are

207 GFP-positive allowing their isolating by FACS and their propagation in mice. Parental or
208 engineered blasts have been xenografted into recipient NSG mice.

209 We treated mice carrying either parental N/F^{WT} and CRISPR-PEST edited blasts with the
210 aforementioned conventional chemotherapy VD combination and measured the proportion of
211 LRC before and after the treatment (**Figure 5c**). We first confirmed that chemotherapy
212 efficiently reduced the leukemic burden in both groups (**Figure 5d**). While the percentage of
213 LRC were comparable between the parental and the CRISPR-PEST PDX T-ALL before
214 treatment (**Figure 5e**), this ratio of LRC was significantly lower in the CRISPR-PEST PDX
215 post-treatment (**Figure 5f**). These results strongly suggest that NOTCH1 signaling induction
216 reduces the pool of LIC under chemotherapy pressure.

217 To evaluate the consequences of NOTCH1 signaling induction on transcriptomically-defined
218 LIC under the pressure of chemotherapy, a total of 3996 GFP+ parental and NOTCH1-ΔPEST
219 blasts were isolated from the treated mice and analyzed by single-cell RNA-seq (**Figure 6a**).
220 We confirmed that CRISPR-PEST edited blasts had higher NOTCH1/MYC and proliferative
221 signatures than N/F^{WT} ones. LIC were identified by scoring using the previously mentioned
222 validated transcriptomic signature. Critically, we found that, under the pressure of
223 chemotherapy, NOTCH1 manipulation reduced LIC pools (**Figure 6b and 6c**) while there was
224 a significative enrichment in LIC in N/F^{WT} samples. These results strongly support that the
225 induction of NOTCH1 signaling renders LIC sensitive to chemotherapy via c-MYC-mediated
226 proliferation and differentiation.

227

228 Overall, our study underpins strong biological evidence to solve the paradoxical impact of
229 NOTCH1 alterations on T-ALL clinical outcome. We report that N/F mutational status shapes
230 the contingent of LIC and their balance between quiescence and proliferation. Given this
231 context, we underpin that the pressure of chemotherapy could be either beneficial or deleterious

232 to prevent disease relapse. We provide the rationale to evaluate interventions forcing LIC to
233 exit quiescence and proliferate in conjunction with standard-of-care chemotherapy to
234 efficiently target them and achieve durable complete remission.

235

236 **DISCUSSION**

237 In this study, we aimed to resolve a paradox we unraveled several years ago namely the better
238 prognosis associated with *NOTCH1/FBXW7* mutations in T-ALL compared to N/F^{WT} T-ALL.
239 We and others have reported in different trials of T-ALL that adult and pediatric patients with
240 N/F^{ALT} were associated with significantly favorable outcomes (Overall Survival and cumulative
241 incidence of relapse), independently of the status of chemotherapy response (MRD). Multiple
242 studies have reported that NOTCH1 is a critical pathway in the development of T-ALL and the
243 maintenance of LIC. We proposed a provocative explanation of the NOTCH1 paradox by
244 hypothesizing that the quiescent behavior of LIC is governed by NOTCH1. Hence, we surmise
245 that, under the aberrant oncogenic signaling as seen in T-ALL, LIC are forced to proliferate
246 under the pressure of a NOTCH1/c-MYC interplay. Actively proliferative LIC can be
247 efficiently targeted by chemotherapy regimens and lead to an overall better clinical response.
248 We demonstrated that the sole induction of NOTCH1 signaling by a characteristic alteration of
249 T-ALL is sufficient to trigger a c-MYC-related proliferative program that renders LIC sensitive
250 to chemotherapy *in vivo*. Conversely, LIC isolated from N/F^{WT} primary T-ALL samples exhibit
251 a robust quiescent signature and fail to respond to treatment. Hence, our observation shed light
252 on the dual impact exerted by the pressure of chemotherapy on the clinical outcome. While it
253 can be efficient to clear highly proliferative cancer cells, such as bulk blasts or NOTCH1-driven
254 LIC, it can select quiescent LIC that can lead to aggressive disease resurgence. Critically, the
255 modality of T-ALL relapse as seen in both adult and pediatric N/F^{WT} patients strongly favors
256 our hypothesis. Indeed, N/F^{WT} patients suffer from very early relapses despite active treatment,

257 suggesting that despite the elimination of bulk cancer cells, quiescent LIC can evade and
258 rapidly repopulate the tumor. On the other hand, N/F^{ALT} patients typically relapse after a longer
259 period of time, rarely before 8 months and mostly between 8 and 36 months under therapy.
260 These relapses coincide with a shift in the treatment from the intensive chemotherapy to the
261 maintenance course, marked by a change in the selection pressure of chemotherapy that may
262 elicit the escape of LIC that have acquired therapy-induced mutations leading to disease
263 relapse.

264 As of today, several paradigms of cancer stem cells and LIC co-exist. Conversely to the
265 pyramidal model that applies to other hematological malignancies such as acute myeloid
266 leukemia, the current T-ALL LIC resembles a dynamic state defined by intrinsic and extrinsic
267 cues. Notably, the oncogenic networks or the environmental pressure including chemotherapy
268 are critical factors that shape the LIC contingent in T-ALL. Such plastic behavior dampens an
269 exhaustive consensual definition of LIC by phenotypic or molecular markers. Hence, to date,
270 only studies carried out at the single cell resolution have successfully identified T-ALL. Our
271 approach underlines this necessity and underpins the contextual plasticity of LIC biology in
272 response to oncogenic and chemotherapeutic pressures combined. This scenario is in line with
273 previous reports and confirms that T-ALL blasts tend to retain some reversible phenotypes of
274 the hematopoietic stem cell and can regain stem-like properties associated with dormancy
275 under certain circumstances.^{18,22} Previous studies have shown how dormant LRC could reactive
276 proliferative programs and generate non-LRC bulk cells while some retain their ability to return
277 to a quiescent state. Some studies have coined that this dynamic plasticity is permitted as long
278 as cancer cells reside in the vicinity of the bone marrow niche and associate with drug
279 resistance.²³ In line with this, LRC cells may favor a localization close to supportive niches
280 such as endosteal, vascular membranes of connective tissue within the bone medulla.^{18,24} While
281 yet to be identified, the microenvironmental signals regulating this specific location may

282 represent attractive targets to circumvent LIC chemoresistance. Of note, a NOTCH1/c-
283 MYC/CD44 axis has been reported to integrate extrinsic and intrinsic cues and sustain the
284 persistence of LIC.²⁵⁻²⁷ A recent study presented data in favor of targeting of this pathway using
285 BET protein degrader to uncouple Myc-dependent functions essential to LIC.²⁸ In contrast, our
286 results suggest that such approaches may represent a risk by displacing the balance toward LIC
287 quiescence and chemoresistance. Rather, we could envisage alternate options aiming at
288 sustaining the proliferative capacities of LIC to maintain them under the pressure of
289 chemotherapy. One seducing approach is the use of nanoparticles expressing NOTCH1 ligands
290 such as DLL4 in combination with chemotherapy which may be carefully examined to leverage
291 LIC eradication.

292 We propose a biological resolution for the NOTCH1 paradox highlighting the imprinting of
293 the oncogenic networks driving T-ALL on the maintenance of a contingent of LIC and their
294 chemorefractory-related state. Our model proposes a novel paradigm of the central role of
295 NOTCH1 in T-ALL progression and may help to propose LIC-targeting therapies to prevent a
296 deadly disease relapse.

297

298 **METHODS**

299 **Patients and primary samples**

300 Adult patients were enrolled in the GRAALL-2003-2005 trials (GRAALL-2003,
301 NCT00222027; GRAALL-2005, NCT00327678). Diagnostic peripheral blood or bone marrow
302 samples were collected after informed consent was obtained at diagnosis, according to the
303 Declaration of Helsinki. All samples contained $\geq 80\%$ blasts, immunophenotypic and molecular
304 characterization of T-ALL samples, minimal residual disease (MRD) assessment, gene
305 mutation screening, MLPA were performed as previously described^{4,14,29}.

306 **Next-generation sequencing, copy number and molecular analysis**

307 Genomic analysis was performed by pan-exon targeted next-generation sequencing (NGS) of
308 DNA extracted from diagnostic samples; DNA libraries were prepared using Nextera XT kit
309 (Illumina) and sequenced on an Illumina MiSeq. The NGS panel included 69 genes known to
310 be mutated in T-ALL. NGS analysis was performed with Polyweb software (Imagine Institute).

311 **Patient-derived xenografts**

312 Patient-derived xenografts (PDXs) were generated from primary T-ALL samples as
313 described.³⁰ Briefly, 10^6 viable leukemic cells were xenografted by intravenous retro-orbital
314 injection in 2-month-old NSG mice. Mice were monitored weekly by flow cytometry for the
315 leukemic load (FSC^{hi}, hCD7⁺, hCD45⁺ cells) in peripheral blood. Mice were euthanized when
316 terminally ill, as evidenced by either severe dyspnea or weakness caused by leukemic
317 dissemination in the thymus or vital organs. Bone marrows from tibiae, hip, femora and
318 vertebrae were collected for subsequent ex vivo experiments. All samples used contained $\geq 90\%$
319 blasts.

320 **Generation of T-ALL PDX with *NOTCH1-PEST* mutation via CRISPR/Cas9 technology**

321 UNT525 *NOTCH1-PEST* mutation was constructed by the Alt-R CRISPR-Cas9 system
322 (Integrated DNA Technologies, Inc.) Three different guide RNAs specific to *NOTCH1* were

323 screened and the oligo ACGTCGCTGCCATCCTCGCTG was chosen for further transfection
324 experiments in UPNT525 PDX T-ALL. Indel mutations within the PEST domain were
325 confirmed by NGS. hCD45+ T-ALL cells of UPNT525 PDX were electroporated with Cas9-
326 gRNA ribonucleoprotein complexes for *NOTCH1-PEST* knock-in. gRNAs were synthesized
327 from Integrated DNA Technologies as Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA. The functional gRNA was
328 created after annealing with Alt-R tracrRNA (Integrated DNA Technologies). Editing
329 efficiency evaluated with TIDE algorithm (<https://tide.nki.nl/>) was around 75%.

330 **Flow cytometry-based assays**

331 Data acquisition and data analysis were conducted at the INEM institute. Cell viability was
332 determined by flow cytometry by Annexin V-APC/propidium iodide co-staining (BD-
333 Pharmingen, San Jose, CA, USA).

334 **Western blotting**

335 Cells were washed in Phosphate Buffered Saline (PBS) and lysed in RIPA buffer (20 mM Tris-
336 HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate,
337 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄) supplemented
338 with protease and phosphatase inhibitors (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail,
339 Thermo Scientific). Cell lysates were separated by SDS-PAGE and transferred onto
340 nitrocellulose membranes. After blocking 1h in blocking buffer (Tween-PBS 5% bovine serum
341 albumin), membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies in blocking
342 buffer (NOTCH1-ICN1). After washes, membranes were incubated for 1h at room temperature
343 with the appropriate secondary antibodies coupled to HRP in blocking buffer.
344 Chemiluminescence signals were revealed using the WestDura Super Signal kit (GE
345 Healthcare Bio-Sciences) on a ChemiDoc XRS from Bio-Rad.

346 **cDNA generation from single cell.**

347 The single cell suspensions with a targeted cell recovery of 10,000 cells per sample were mixed
348 with Master Mix and loaded into the Chromium Chip A along with the barcoded Single Cell
349 VDJ 5' Gel Beads v1 and Partitioning Oil. The nanoliter-scale Gel Beads-in-emulsion (GEMs)
350 were generated using 10x Chromium Controller. Next, GEMs were captured and incubated
351 (Step 1: 53 °C for 45 min, Step 2: 85 °C for 5 min) to produce 10xBarcoded with unique
352 molecular index (UMI), full-length cDNA from polyadenylated mRNA in reverse transcription
353 reaction. Following steps included breaking the GEMs, Post GEM-RT Cleanup and PCR
354 amplification of released cDNA with primers against common 5' and 3' ends added during
355 GEM- RT (Step 1: 98 °C for 45 s, Step 2: 98 °C for 20 s, Step 3: 67 °C for 30 s, Step 4: 72 °C
356 for 1 min, Step 5: 72 °C for 1 min, Hold: 4 °C; Steps 2–4 were performed in total of 13 cycles).
357 The obtained cDNA was cleaned-up using SPRIselect Reagent Kit (Beckman
358 Coulter, Brea, CA, USA) and quantified using an Agilent 4200 Tape Station HS
359 D5000 Assay (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Such prepared cDNA
360 was further used to generate 5'GEX libraries.

361

362 **Construction of 5'GEX libraries.**

363 50 ng mass of cDNA of each sample was used. The main steps of 5'GEX library preparation
364 included: (1) fragmentation, end repair and A-tailing followed by double sided size selection
365 (2) adapter ligation with post-ligation cleanup, and 3) sample index PCR followed by the
366 double-sided cleanup and QC. The enzymatic fragmentation and size selection (SPRIselect
367 Reagent Kit, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) were used to optimize the cDNA amplicon
368 size followed by adding P5 and P7 sample indexes (used in Illumina sequencers), and Illumina
369 R2 sequence via processes of end repair, A-tailing (Hold: 4 °C, Step 1: 32 °C for 5 min, Step
370 2: 65 °C for 30 min, Hold: 4 °C), adapter ligation (20 °C for 15 min, Hold: 4 °C) and Sample
371 Index PCR (Step 1: 98 °C for 45 sec, Step 2: 98 °C for 20 sec, Step 3: 54 °C for 30 s, Step 4:

372 72 °C for 20 s, Step 5: 72 °C for 1 min, Hold: 4 °C; Steps 2–4 were performed in total of 14
373 cycles) using Chromium i7 Sample Index (PN-220103, 10x Genomics, Pleasanton, CA, USA).

374

375 **Preprocessing of single-cell RNA sequencing data**

376 Raw FASTQ files were processed with CellRanger software (v3.0.0 or 3.0.1), which performs
377 alignment, filtering, barcode counting and UMI counting. CellRanger software was used to
378 align reads with the GRch38 genome and generate count matrixes. Further data analyses were
379 conducted using the R Seurat package (v4) (Hao et al. Cell 2021). Low-quality cells were
380 excluded in an initial quality-control step, which removed genes expressed in fewer than three
381 cells and cells expressing fewer than 200 or more than 2500 genes. Cells with more than 5%
382 mitochondrial genes in samples were excluded. Datasets were then integrated into a single
383 SeuratObject using the *SCTransform* and *glmGamPoi* methods (RPCA). Cell type calling was
384 performed using SingleR and the *blueprint.se* reference (Aran D et al Nature Immunol 2019).
385 Contaminant stromal cells or of myeloid lineage were excluded. Louvain clustering and UMAP
386 projection were performed by Seurat using default parameters.

387

388 **LIC identification and exploration of transcriptomic signatures**

389 A consensus LSC signature was established from the literature (Ebinger et al, Eppert et al Nat
390 Med 2011) and scored in our dataset using the *AddModuleScore* function of Seurat. Based on
391 the distribution of Z-scores of this signature scoring, an optimal threshold value of 1 was used
392 to confidently define a transcriptomic LIC. Additional signatures were extracted from MSigDb
393 to evaluate LIC quiescence, proliferation, and NOTCH1/c-MYC scores
394 (GRAHAM_NORMAL_QUIESCENT_VS_NORMAL_DIVIDING_UP,
395 WHITFIELD_CELL_CYCLE_LITERATURE, HALLMARK_NOTCH_SIGNALING,

396 HALLMARK_MYC_TARGETS). The R package *tricycle* (Zheng et al Genome Biology
397 2022) and Seurat-based cell cycle scorer were used to confirm the cell cycling of cells.
398

399 **Acknowledgements**

400 The authors thank all the participants of the GRAALL-2003 and GRAALL-2005 study groups,
401 the SFCE and the investigators of the 16 SFCE centers involved in collection and provision of
402 data and patient samples, and V. Lheritier for collection of clinical data.

403

404 **Financial supports:**

405 This work was supported by grants to Necker laboratory from the CAncer Research for
406 PErsonalized Medicine (CARPEM), Association pour la Recherche contre le Cancer (Equipe
407 labellisée), Institut National du Cancer PRT-K 18-071, Fédération Leucémie Espoir. The
408 GRAALL was supported by grants P0200701 and P030425/AOM03081 from the Programme
409 Hospitalier de Recherche Clinique, Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, France and the
410 Swiss Federal Government in Switzerland. Samples were collected and processed by the AP-
411 HP "Direction de Recherche Clinique" Tumor Bank at Necker-Enfants Malades. M. Simonin
412 was supported by « Action Leucémie », "Ligue contre le Cancer" et « Soutien pour la formation
413 à la recherche translationnelle en cancérologie - Plan cancer 2009-2013 ». G. P. Andrieu was
414 supported by the Fondation de France (FDF).

415

416

417 **References**

- 418 1. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*.
419 2014;14(3):275–291.
- 420 2. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic
421 stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014;506(7488):328–333.
- 422 3. Velten L, Story BA, Hernández-Malmierca P, et al. Identification of leukemic and
423 pre-leukemic stem cells by clonal tracking from single-cell transcriptomics. *Nat Commun*.
424 2021;12(1):1366.
- 425 4. Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, et al. Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in
426 T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid
427 lineage commitment. *Blood*. 2003;101(7):2693–2703.
- 428 5. Desjonquères A, Chevallier P, Thomas X, et al. Acute lymphoblastic leukemia
429 relapsing after first-line pediatric-inspired therapy: a retrospective GRAALL study. *Blood*
430 *Cancer J*. 2016;6(12):e504.
- 431 6. Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, et al. In adults with standard-risk acute
432 lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic
433 transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective
434 than conventional consolidation/maintenance chemotherapy in all patients: final results of the
435 International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). *Blood*. 2008;111(4):1827–1833.
- 436 7. Bhojwani D, Pui C-H. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*
437 *Oncol*. 2013;14(6):e205-217.
- 438 8. Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic
439 leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 2016;16(8):494–507.
- 440 9. Koch U, Radtke F. Notch in T-ALL: new players in a complex disease. *Trends*
441 *Immunol*. 2011;32(9):434–442.
- 442 10. O’Neil J, Grim J, Strack P, et al. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH
443 pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J. Exp. Med*.
444 2007;204(8):1813–1824.
- 445 11. King B, Trimarchi T, Reavie L, et al. The ubiquitin ligase FBXW7 modulates
446 leukemia-initiating cell activity by regulating MYC stability. *Cell*. 2013;153(7):1552–1566.
- 447 12. Palomero T, Lim WK, Odom DT, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and
448 activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc*.
449 *Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2006;103(48):18261–18266.
- 450 13. Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang CV. MYC, Metabolism, and
451 Cancer. *Cancer Discov*. 2015;5(10):1024–1039.
- 452 14. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, et al. Toward a
453 NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute
454 lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia
455 study. *J. Clin. Oncol*. 2013;31(34):4333–4342.
- 456 15. Petit A, Trinquand A, Chevret S, et al. Oncogenetic mutations combined with MRD
457 improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*.
458 2018;131(3):289–300.
- 459 16. Sharma SV, Lee DY, Li B, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state

460 in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2010;141(1):69–80.

461 17. Li B, Brady SW, Ma X, et al. Therapy-induced mutations drive the genomic
462 landscape of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2020;135(1):41–55.

463 18. Ebinger S, Özdemir EZ, Ziegenhain C, et al. Characterization of Rare, Dormant, and
464 Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2016;30(6):849–
465 862.

466 19. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, et al. Identification of therapeutic targets for
467 quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci Transl Med*.
468 2010;2(17):17ra9.

469 20. Zeller KI, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV. An integrated database
470 of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct
471 genomic targets. *Genome Biol*. 2003;4(10):R69.

472 21. Schlosser I, Hölzel M, Hoffmann R, et al. Dissection of transcriptional programmes in
473 response to serum and c-Myc in a human B-cell line. *Oncogene*. 2005;24(3):520–524.

474 22. Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat*
475 *Rev Immunol*. 2010;10(3):201–209.

476 23. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer cell lines for drug discovery and development.
477 *Cancer Res*. 2014;74(9):2377–2384.

478 24. Morrison SJ, Spradling AC. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem
479 Cell Maintenance throughout Life. *Cell*. 2008;132(4):598–611.

480 25. Armstrong F, de la Grange PB, Gerby B, et al. NOTCH is a key regulator of human
481 T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood*. 2009;113(8):1730–1740.

482 26. García-Peydró M, Fuentes P, Mosquera M, et al. The NOTCH1/CD44 axis drives
483 pathogenesis in a T cell acute lymphoblastic leukemia model. *J. Clin. Invest*.
484 2018;128(7):2802–2818.

485 27. Schubbert S, Cardenas A, Chen H, et al. Targeting the MYC and PI3K pathways
486 eliminates leukemia-initiating cells in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*.
487 2014;74(23):7048–7059.

488 28. Piya S, Yang Y, Bhattacharya S, et al. Targeting the NOTCH1-MYC-CD44 axis in
489 leukemia-initiating cells in T-ALL. *Leukemia*. 2022;

490 29. Bond J, Marchand T, Touzart A, et al. An early thymic precursor phenotype predicts
491 outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a
492 Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *Haematologica*.
493 2016;101(6):732–740.

494 30. Trinquand A, Dos Santos NR, Tran Quang C, et al. Triggering the TCR
495 Developmental Checkpoint Activates a Therapeutically Targetable Tumor Suppressive
496 Pathway in T-cell Leukemia. *Cancer Discov*. 2016;6(9):972–985.

497

498

499

500 **Figures Legend**

501

502 **Figure 1. Modality of T-ALL relapse and *NOTCH1/FBXW7* mutational status**

503 **A.** Comparison of Cumulative incidence of relapse (CIR) at 5 years according to
504 *NOTCH1/FBXW7* status in 476 T-ALL. *NOTCH1/FBXW7* Mut (N/F^{Mut}) T-ALL are associated
505 with a significant lower CIR compared to *NOTCH1/FBXW7* Wild-type (N/F^{WT}) patients.

506 **B.** Comparison of the proportion of relapse over time according to the N/F status. Most of the
507 T-ALL N/F^{WT} relapses occurred during the first 12 months from diagnosis with a peak of
508 frequency around 8 months. Conversely, T-ALL N/F^{Mut} mostly relapse after 12 months of
509 treatment initiation.

510 **C.** Delay of relapse according to the N/F status. N/F^{WT} T-ALL relapses occurred significantly
511 earlier than N/F^{Mut} T-ALL.

512 **D.** Histogram indicating the distribution of relapse times across our T-ALL cohort of 476
513 patients according to their N/F status. Purple indicated very early relapses (<8 months from
514 diagnosis) likely relapsing due to a preexisting resistant clone (schematic representation at
515 bottom) consistent with the presence of the leukemia initiating cell (LIC) present in a quiescent
516 state in T-ALL N/F^{WT} that survives initial treatment. Green represents early relapses (8 to 36
517 months) consistent with appearance of resistant clone issued from a persister clone that survives
518 initial treatment and potentially acquired therapy-induced mutation.

519 **E.** Temporal distribution of relapse according to the N/F status. Very early relapses are more
520 frequent in N/F^{WT} T-ALL compared to N/F^{Mut} T-ALL.

521

522 **Figure 2. T-ALL LIC identification by single-cell transcriptomics**

523 **A.** Overall UMAP representation of all scRNA-Seq cells including 13 T-ALL samples
524 colored by sample populations.

525 **B.** Visualization of the LSC (leukemia stem cell) gene expression signature on UMAP plot
526 of N/F^{WT} (left) and N/F^{Alt} (right panel) T-ALL samples.

527 **C.** Comparison of the Module score calculated for the LSC signature applied onto the T-
528 ALL samples according their N/F status. N/F^{Alt} T-ALL cells are enriched in LSC signature
529 compared to N/F^{WT} T-ALL (positivity defined for a Z-score threshold ≥ 1).

530 **D.** Visualization of the Quiescence (up panel) and MYC signature (bottom panel) on
531 UMAP plot among the cells previously identified as LSC in N/F^{WT} (left panel) and N/F^{Alt} (right
532 panel) T-ALL samples.

533 **E.** Comparison, according the *N/F* status, of the Module score calculated for the
534 Quiescence, NOTCH1 pathway, Myc and Cell Cycle signatures applied to the previously
535 identified LSC. *N/F^{ALT}* T-ALL LSC are associated with NOTCH1/MYC-driven proliferative
536 cells, whereas *N/F^{WT}* T-ALL LIC were transcriptionally defined as quiescent.

537

538 **Figure 3. NOTCH1/FBXW7 mutational status influences the LIC pool in T-ALL**

539 **A.** Visualization of the quiescence (left panel) and the LSC composite signatures (middle
540 panel) and the overlay of the two signatures on UMAP plot among the cells previously
541 identified as LSC in *NF^{WT}* (up panel) and *N/F^{Alt}* (bottom panel) T-ALL samples. In case of
542 strong overlay between the 2 signatures, cells appear light purple. LSC of *N/F^{WT}* T-ALL are
543 mostly composed of LSC in quiescent state.

544 **B.** Visualization of the NOTCH1 pathway (left panel) and MYC signatures (middle panel)
545 and the overlay of the two signatures on UMAP plot among the cells previously identified as
546 LSC in *NF^{WT}* (up panel) and *N/F^{Alt}* (bottom panel) T-ALL samples. In case of overlay between
547 the 2 signatures, cells appear light purple. LSC of *N/F^{Mut}* T-ALL are mostly composed of LSC
548 harboring NOTCH1 and Myc signature and as expected we observed a strong overlay between
549 these 2 signatures.

550 **C.** Visualization of the Myc (left panel) and proliferation signatures (middle panel) and
551 the overlay of the two signatures on UMAP plot among the cells previously identified as LSC
552 in *NF^{WT}* (up panel) and *N/F^{Alt}* (bottom panel) T-ALL samples. In case of overlay between the
553 2 signatures, cells appear light blue. LSC of *N/F^{Mut}* T-ALL are mostly composed of LSC in a
554 Myc-driven proliferation state.

555

556 **Figure 4. Identification of T-ALL LIC in PDX models**

557 **A.** Experimental procedure of generating PDX T-ALL cells stain with CFSE.

558 **B.** Gating strategy defining LRC and non-LRC and others according the MFI of CFSE at the
559 end of experiment compared with CFSE MFI at the start of the experiment.

560 **C.** Proportion of LRC were similar between *N/F^{WT}* and *N/F^{Alt}* T-ALL at the time of T-ALL
561 development.

562 **D.** Cell cycle analysis according the LRC status based on Ki-67 and Vybrant DyeCycle
563 (reflecting the DNA content). LRC are mostly in a quiescent state (G0 and G1 phases) whereas
564 non-LRC are associated with a pro-proliferative profile

565 **E.** Proportion of LRC and non-LRC after chemotherapy (Vincristine and Dexamethasone

566 during 4 days) vs control (PBS during 4 days) treatment in *N/F^{WT}* and *N/F^{Alt}* T-ALL. *N/F^{WT}* T-
567 ALL are associated with a significant increase of LRC ratio post-chemotherapy compared to
568 *N/F^{Alt}* T-ALL.

569

570 **Figure 5. NOTCH1 activation signaling reshape LIC populations**

571 **A.** Generation of a frameshift mutation affecting the NOTCH1-PEST domain in a *N/F^{WT}* T-
572 ALL PDX using CRISPR-cas9 system.

573 **B.** CRISPR/Cas9-induced NOTCH1-PEST truncation leads to ICN1 accumulation in *N/F^{WT}* T-
574 ALL PDX.

575 **C.** Experimental procedure of generating PDX T-ALL issued from parental T-ALL *N/F^{WT}* and
576 *N/F^{CRISPR-PEST}* after staining with CFSE and followed by systemic chemotherapy exposition after
577 re-injection in mice model.

578 **D.** Evaluation of residual disease after PBS vs chemotherapy treatment in PDX T-ALL *N/F^{WT}*
579 and *N/F^{CRISPR-PEST}*. In both, *N/F^{WT}* and *N/F^{CRISPR-PEST}*, chemotherapy result in significant decrease of
580 leukemic burden.

581 **E.** Comparison of LRC proportion at the time of T-ALL development reveals a relatively
582 similar rate of LRC in both condition *N/F^{WT}* and *N/F^{CRISPR-PEST}*.

583 **F.** Comparison of LRC proportion after chemotherapy or PBS confirms the increase of LRC
584 ratio in the parental *N/F^{WT}* model whereas induction of NOTCH1 pathway via generation of
585 *N/F^{CRISPR-PEST}* leads to reduce the LRC ratio after chemotherapy exposition.

586

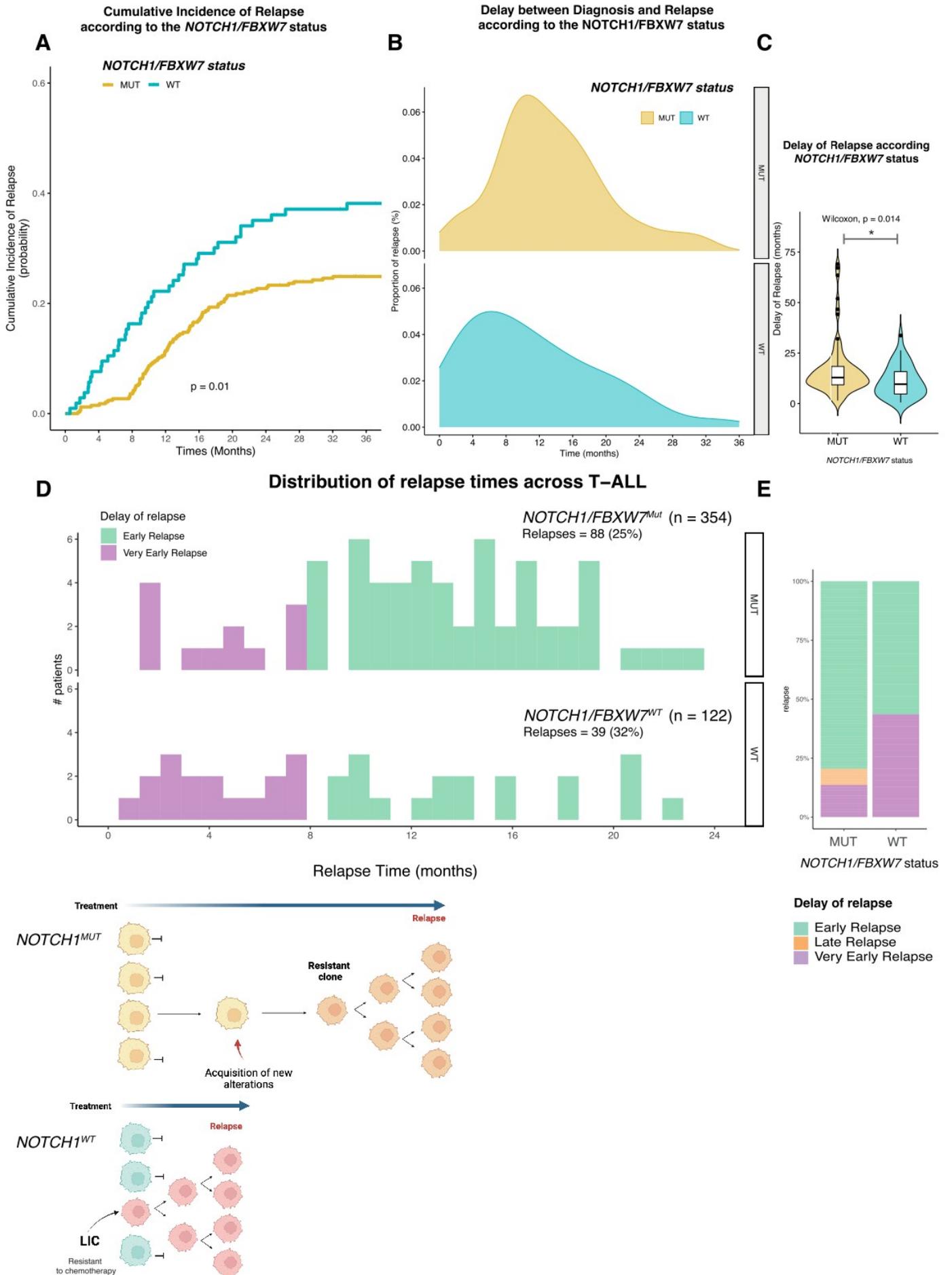
587 **Figure 6. Induction of NOTCH1 signaling renders LIC sensitive to chemotherapy via c-** 588 **MYC-mediated proliferation**

589 **A.** UMAP representation of 3996 GFP+ parental and NOTCH1- Δ PEST blasts isolated from
590 the treated mice with chemotherapy (Vincristine/Dexamethasone, VD) or PBS as control.

591 **B.** Visualization of the NOTCH1 signature on UMAP plot of parental or NOTCH1^{WT} (left
592 panel) and NOTCH1- Δ PEST or NOTCH1^{Mut}(right panel) blasts according to treatment
593 regimen (PBS or VD). CRISPR-PEST edited blasts had higher NOTCH1/MYC and
594 proliferative signatures than *N/F^{WT}* ones

595 **C.** Visualization of the LSC composite signature on UMAP plot of parental or NOTCH1^{WT}(left
596 panel) and NOTCH1- Δ PEST or NOTCH1^{Mut}(right panel) blasts according to treatment regimen
597 (PBS or VD). Under the pressure of chemotherapy, NOTCH1 manipulation reduced LIC pools
598 while there was a significative enrichment in LIC in *N/F^{WT}* samples.

Figure 1



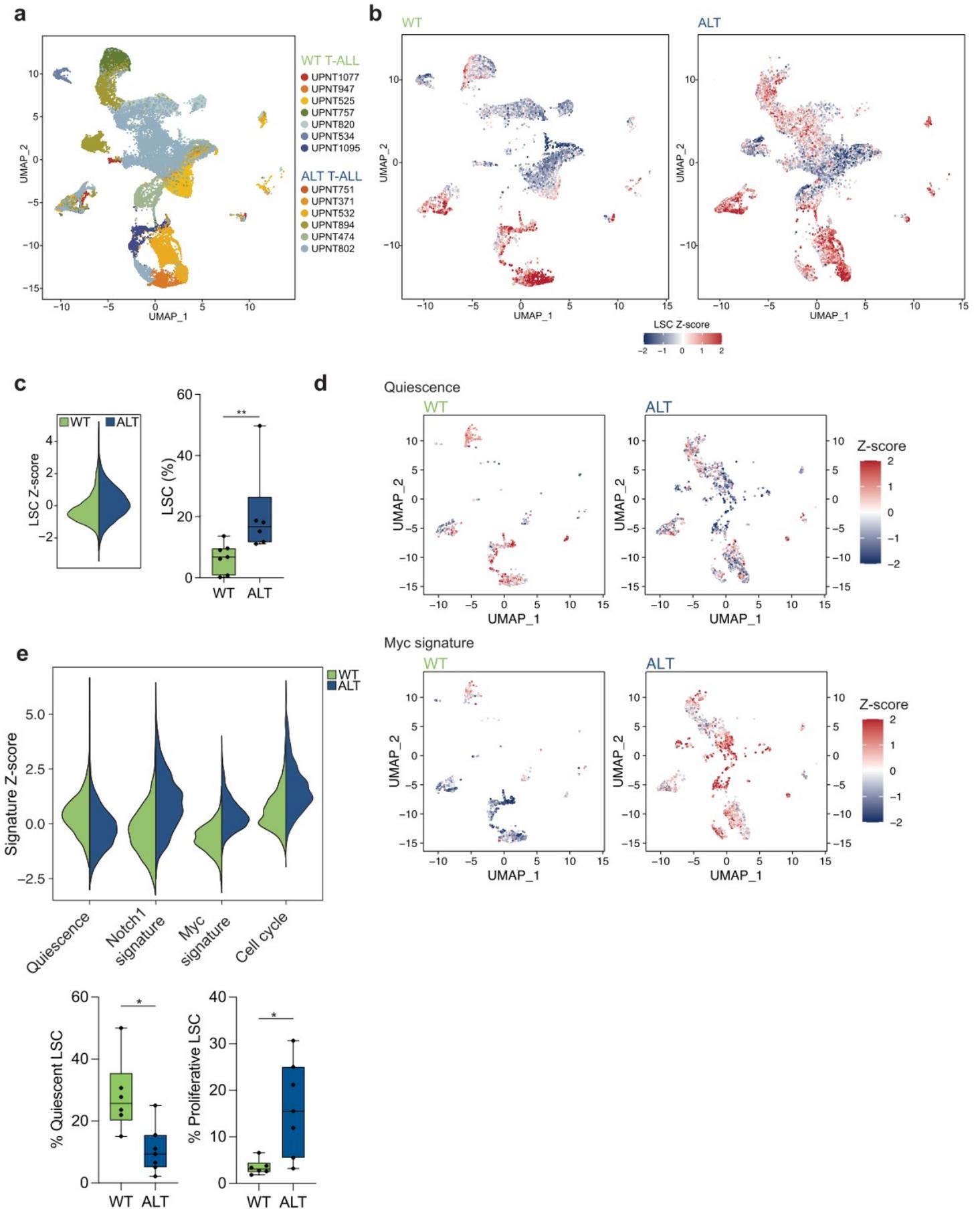
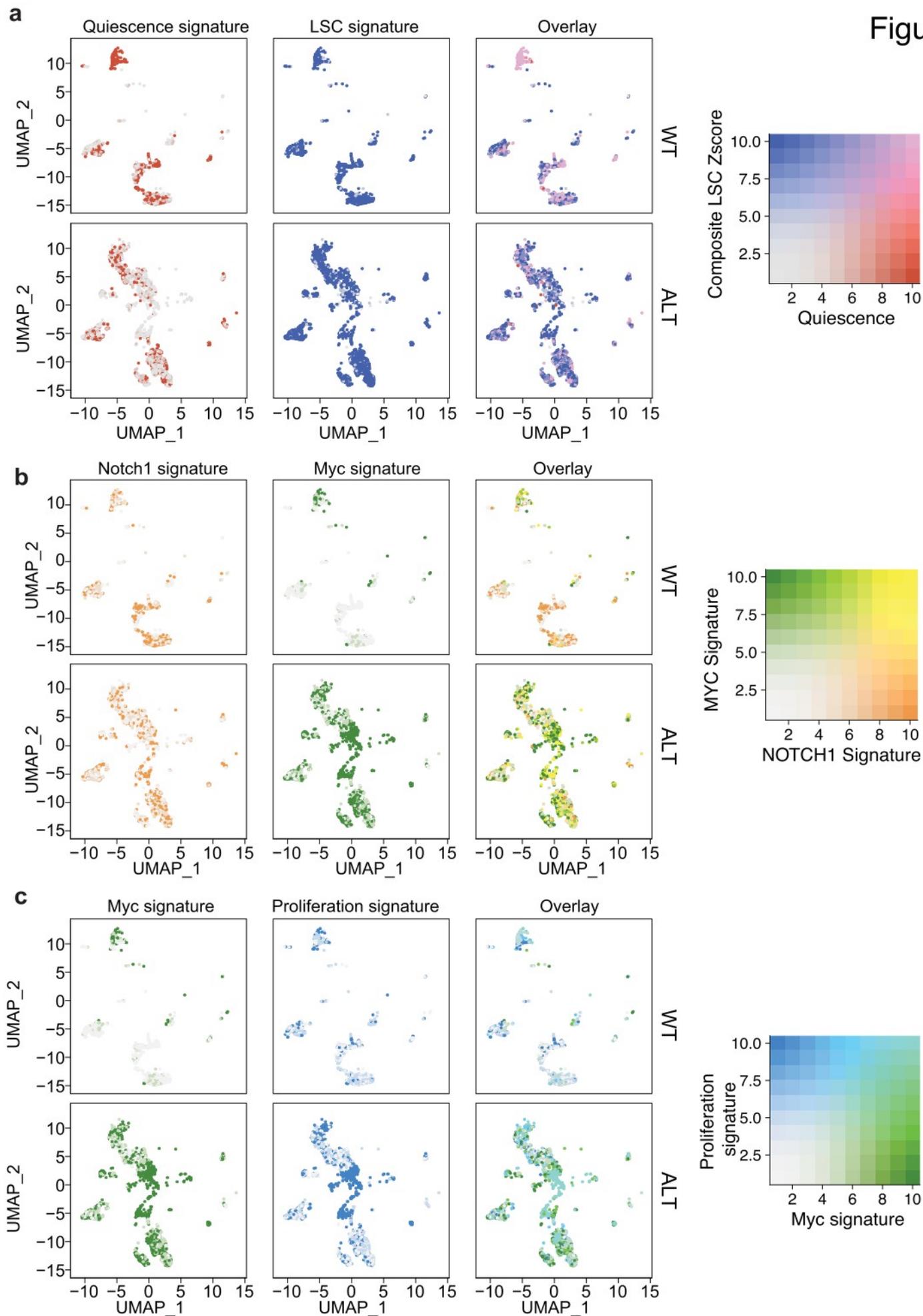


Figure 3.



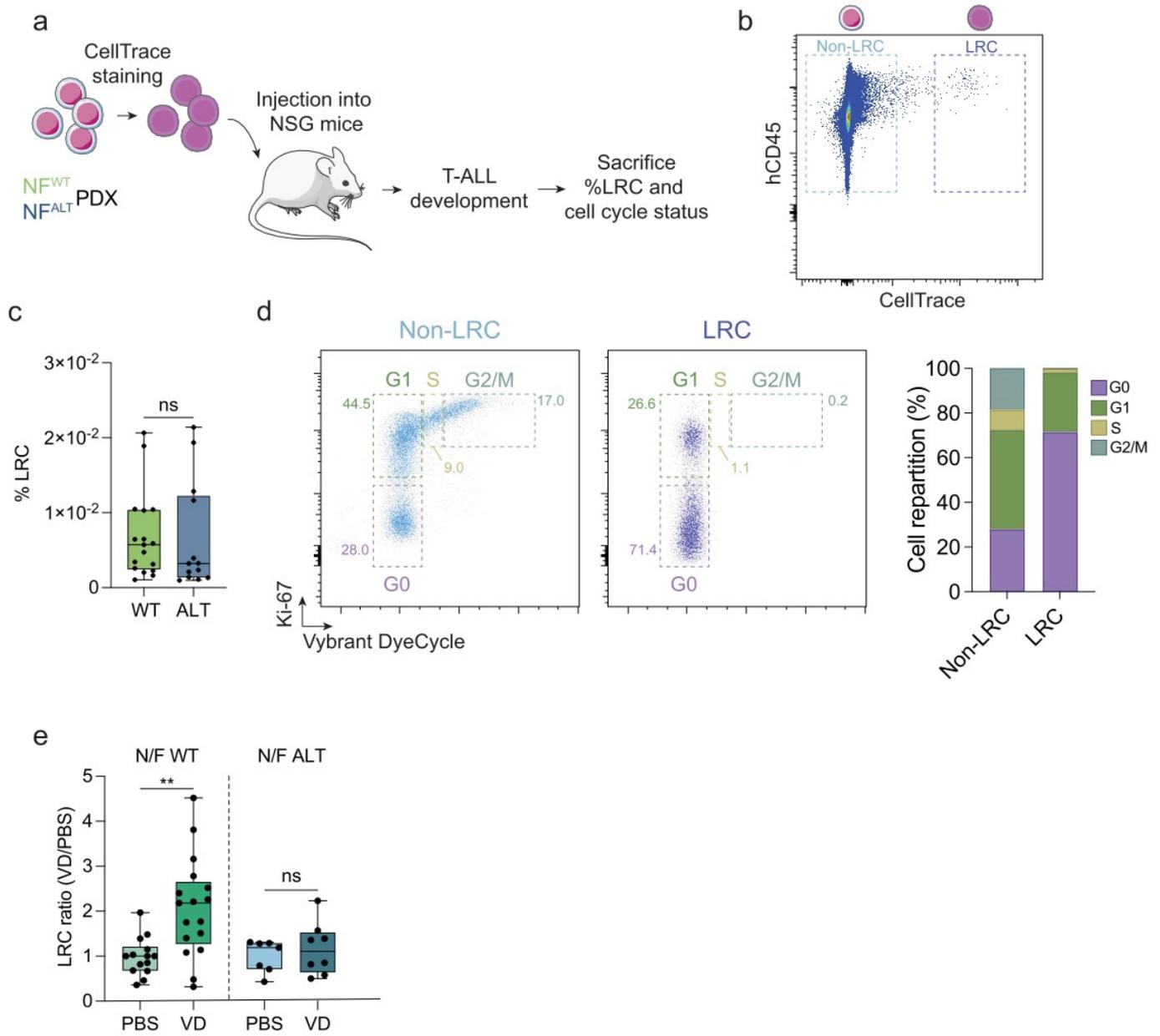


Figure 4.

Figure 5.

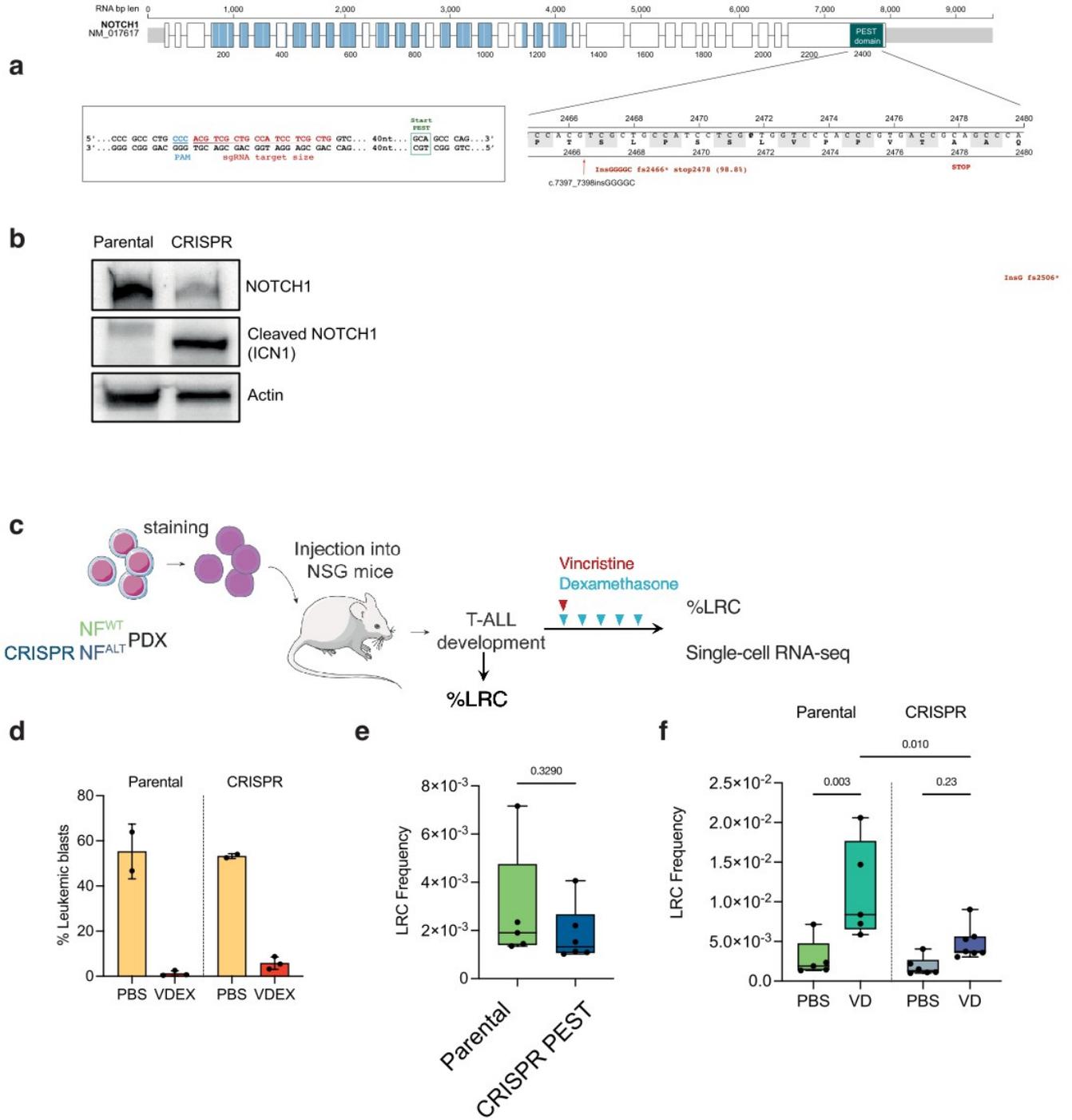
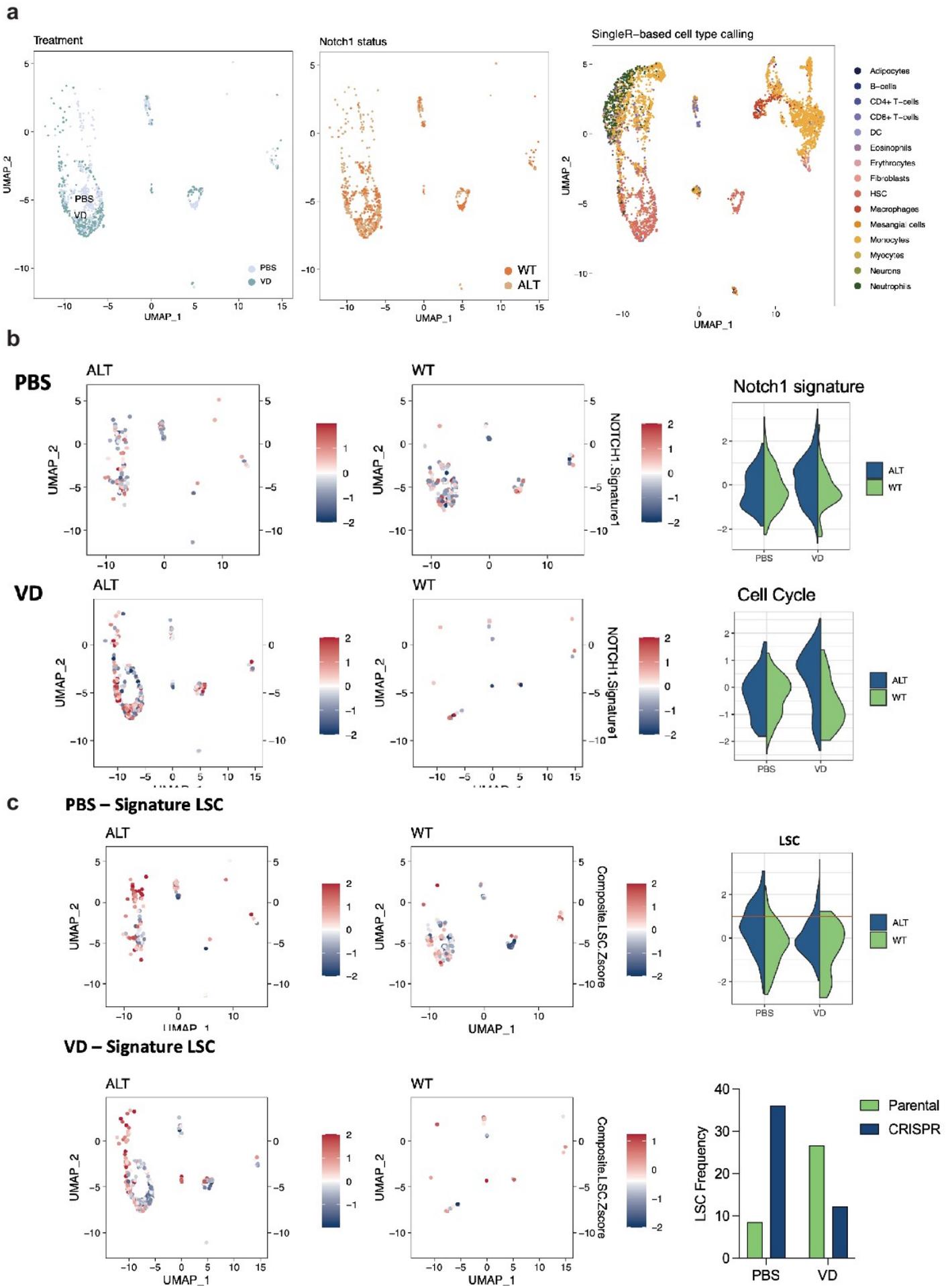


Figure 6.



Discussion, perspectives et conclusions

Vers une stratification moléculaire intégrée dans les LAL-T combinant les données mutationnelles, transcriptomiques, épigénétiques et structurelles.

La première partie du travail était consacrée à l'exploration du paysage mutationnel des LAL-T conduisant à la mise en évidence de nouvelles altérations moléculaires associées à un impact pronostique jusqu'ici non rapportées. Cet objectif s'est principalement appuyé sur les analyses de séquençage à haut débit (NGS, *Next Generation Sequencing*) que nous avons réalisé dans le laboratoire chez plus de 1200 patients atteints d'hémopathies T dont près 1000 LAL-T. Parmi cette cohorte d'analyse sans équivalent à l'échelle internationale nous disposons d'annotations cliniques et biologiques pour 476 patients adultes et pédiatriques issus des cohortes protocolaires des essais cliniques GRAALL03/05 chez les adultes et l'essai FRALLE2000T en pédiatrie. L'analyse de ces données moléculaires confrontée aux informations de survie et de réponse à la chimiothérapie nous a donc conduit à décrire pour la première fois les impacts pronostiques associés à la présence de différentes altérations moléculaires dans les LAL-T. Ainsi nous avons rapporté au cours de ma thèse, l'impact pronostique associé à la présence d'altérations affectant *IKZF1* (article 1), *PTPN2* (annexe 1), *IDH1/2* (article 2) et *TP53* (article 4). Dans un second temps, l'analyse intégrative de ces différentes altérations nous a conduit à définir une nouvelle stratification pronostique dans les LAL-T (article 3) qui jusqu'ici s'appuyait sur les altérations des 4 gènes *NOTCH1*, *FBXW7*, *N-K RAS* et *PTEN*. Nous proposons une nouvelle stratification, à l'ère du NGS, qui prendrait en compte les altérations de *DNMT3A*, *IKZF1*, *TP53*, *N-K RAS*, les gènes impliqués dans la voie PI3K (*PTEN*, *PIK3CA*, *PIK3R1*) et *NOTCH1/FBXW7*. Ce nouveau classifieur élaboré à partir des données de NGS nous a également permis d'identifier un sous-groupe de patient à très haut risque d'évolution défavorable après intégration des paramètres clinico-biologiques « historiques » (taux de globules blancs au diagnostic $\geq 100 \times 10^9/L$ et MRD $\geq 10^{-4}$). Nous proposons que ces patients dont le taux de survie sans événement est proche de 20% doivent bénéficier d'une prise en charge thérapeutique innovante et/ou intensifiée d'emblée.

Cependant, l'oncogénèse des LAL-T ne peut se résumer aux seules anomalies mutationnelles. Les dérégulations transcriptionnelles, épigénétiques et les anomalies en termes

de nombre de copies (*Copy Number Variation*, CNV) jouent également un rôle majeur dans le développement des LAL-T et pourraient donc constituer des facteurs pronostiques indépendants. Pourtant, à l'heure actuelle, peu d'études ont étudié l'impact de ce type d'altérations sur le pronostic des LAL-T.

Sur le plan de l'étude des dérégulations épigénétiques dans les LAL-T, un travail récemment mené au sein du laboratoire a analysé les profils de méthylation de l'ADN avec une résolution pangénomique chez 143 patients issus des protocoles GRAALL03/05 (puces Illumina Infinium Methylation EPIC BeadChip) (Touzart et al., 2021). Nos résultats indiquent que les LAL-T présentent une signature épigénétique hétérogène et nous ils nous ont également permis d'identifier un sous-groupe de LAL-T au profil hypométhylé et au comportement agressif, caractérisé par un phénotype de précurseur thymique précoce (ETP) et, de façon plus surprenante, un sous-groupe de LAL-T provenant du groupe hyperméthylé mais associé à un mauvais pronostic. D'un point de vue thérapeutique, ce sous-groupe était sensible à l'activité d'agents déméthylants *in vivo*, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques.

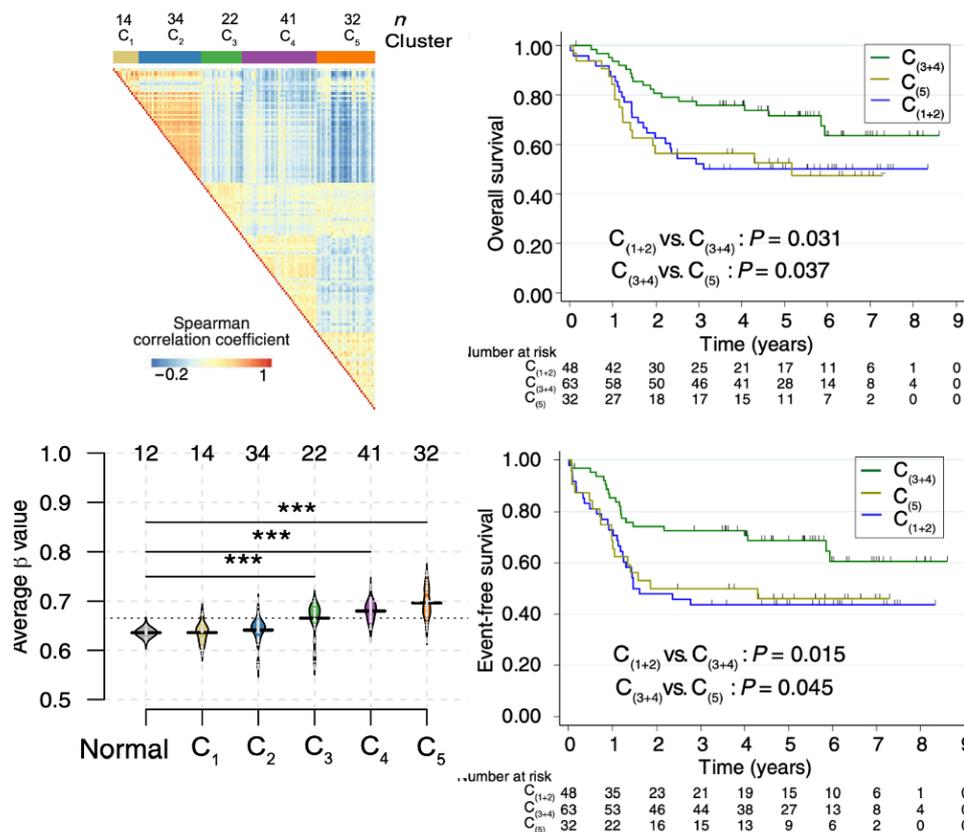


Figure 46 Analyse du profil de méthylation de l'ADN en EPIC array chez 143 LAL-T adultes

L'analyse du profil de méthylation de l'ADN des LAL-T révèle l'existence de 5 clusters définis selon le degré de méthylation. Classiquement les LAL-T hypométhylées (C1 et C2) présentent un pronostic plus défavorable que les hyperméthylées (C3 et C4). De façon remarquable nous avons mis en évidence un sous-groupe de haut risque au sein des LAL-T hyperméthylées (C5), ce groupe présente une sensibilité aux agents déméthylants. (Touzart et al., 2021)

Une étude du NOPHO (*NOrdic Pediatric Hematology-Oncology association*) a également rapporté l'impact pronostique associé au profil de méthylation de l'ADN dans une série de 65 LAL-T pédiatriques chez qui a été réalisé une analyse du méthylome (*HumMeth450K methylation array* couvrant plus de 480,000 sites CpG). Les auteurs ont identifié près de 1,300 sites CpG dont l'analyse du profil de méthylation (CIMP, *CpG island methylator phenotype*) permettait de clustériser les LAL-T en 2 groupes, CIMP⁺ et CIMP⁻, de façon notable le groupe CIMP⁻ présentait un pronostic significativement plus défavorable que le groupe CIMP⁺ (Borssén et al., 2016) (Figure 47).

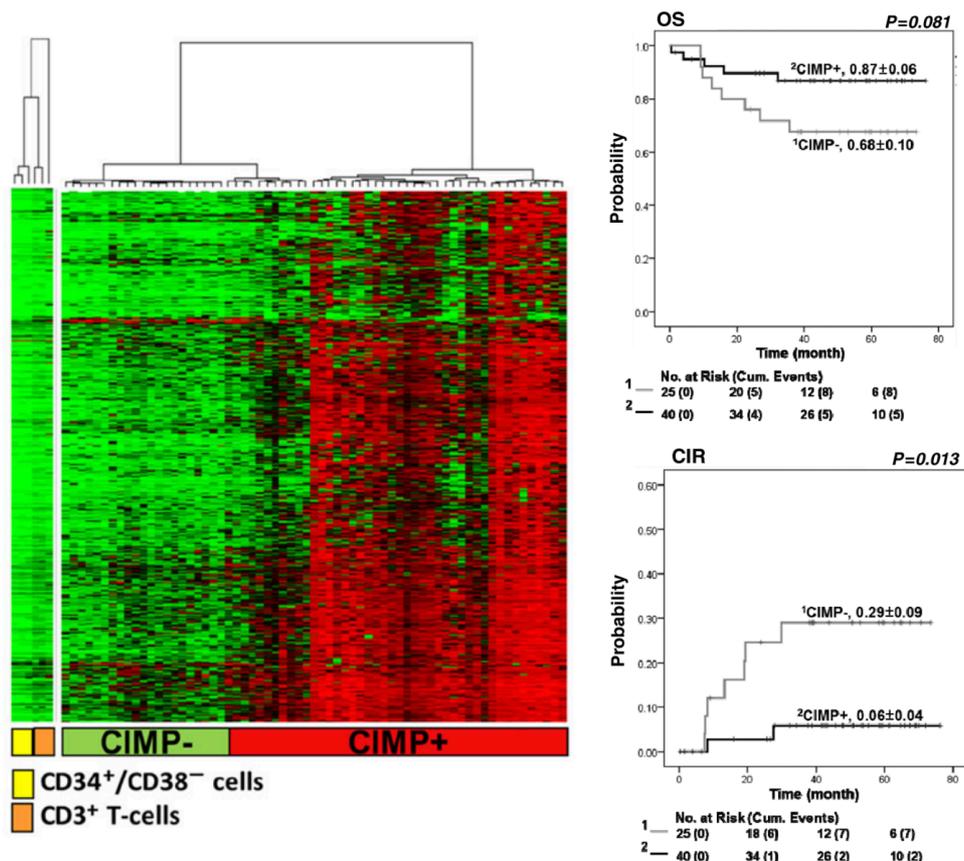


Figure 47 Impact pronostique du profil de méthylation dans les LAL-T (NOPHO)

Le profil de méthylation de 1,293 site CpG ou CIMP (pour *CpG island methylator phenotype*), réalisé chez 65 LAL-T permet de définir 2 clusters CIMP⁺ et CIMP⁻. De façon intéressante les auteurs rapportent un impact pronostique associé au profil CIMP avec notamment un pronostic défavorable associé au profil hypométhylé (CIMP⁻) (Borssén et al., 2016).

L'étude des dérégulations transcriptomiques pourraient également apporter de nouvelles informations à la fois sur les processus impliqués au cours de l'oncogenèse T mais pourraient également fournir des éléments quantifiables contribuant à la prédiction du risque de rechute dans les LAL-T. Peu d'études ont, à ce jour, cherché à démontrer l'impact pronostique associé à un certain type de profil transcriptionnel. On citera le travail récent réalisé par Peng et al. ; à

partir d'une centaine de LAL-T adultes et pédiatriques les auteurs ont réalisé une analyse transcriptomique en RNA-seq « global » afin de déterminer, par une approche de régression linéaire multiple (RLM) de type LASSO, les gènes dont la dérégulation était associée à un impact pronostic significatif. Grâce à cette approche les auteurs ont établi une liste de 5 gènes (*SPATA45*, *GOT1L1*, *TOPAZ1*, *ACTRT2* et *ZBPB*) dont les niveaux d'expression étaient prédictifs du risque de rechute. Un résultat que les auteurs ont reproduit dans un second temps au sein d'une cohorte de validation (Figure 48). Il s'agit du premier « classifieur transcriptomique » dans les LAL-T que les auteurs ont nommé 5-GEC (*5-Gene Expression Classifier*) (Peng et al., 2022). Il apparaît pertinent de vérifier sa validité dans nos cohortes de LAL-T mais également de le confronter à nos données de NGS afin d'évaluer si ce classifieur apporte des informations complémentaires au statut mutationnel des patients.

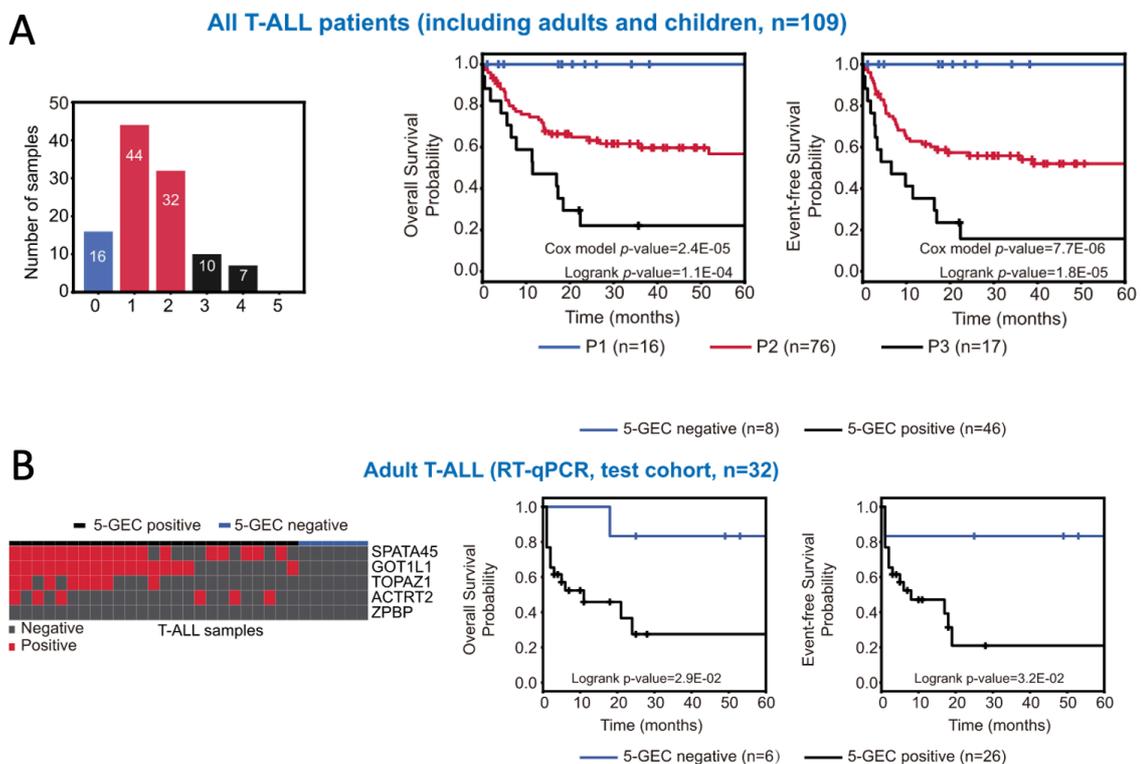


Figure 48 Proposition de classifieur transcriptomique dans les LAL-T

Les auteurs ont établi un classifieur transcriptomique à partir de l'analyse en RNA-seq de 109 LAL-T adultes et pédiatriques (A), qui reposait sur l'analyse de 5 gènes (*SPATA45*, *GOT1L1*, *TOPAZ1*, *ACTRT2* et *ZBPB*). Ils ont reproduit ce classifieur dans une cohorte de validation de 32 LAL-T adultes en évaluant le niveau d'expression des 5 gènes du panel par RT-qPCR (B). (Peng et al., 2022)

Tian et al. ont effectué une approche sensiblement similaire au sein d'une cohorte de lymphomes lymphoblastiques T (LBL-T) en comparant les gènes différentiellement exprimés entre une cohorte de 28 LBL-T ayant bien répondu à la chimiothérapie vs 22 LBL-T en progression post-chimiothérapie. Une analyse par RLM leur a permis de proposer un score complexe reposant sur l'intégration de l'expression de 11 gènes spécifiquement dérégulés entre les 2 groupes. Les auteurs ont ensuite testé la reproductibilité de ce score de risque (*risk score* : *RS*) dans 2 cohortes de validations (Tian et al., 2020) (Figure 49).

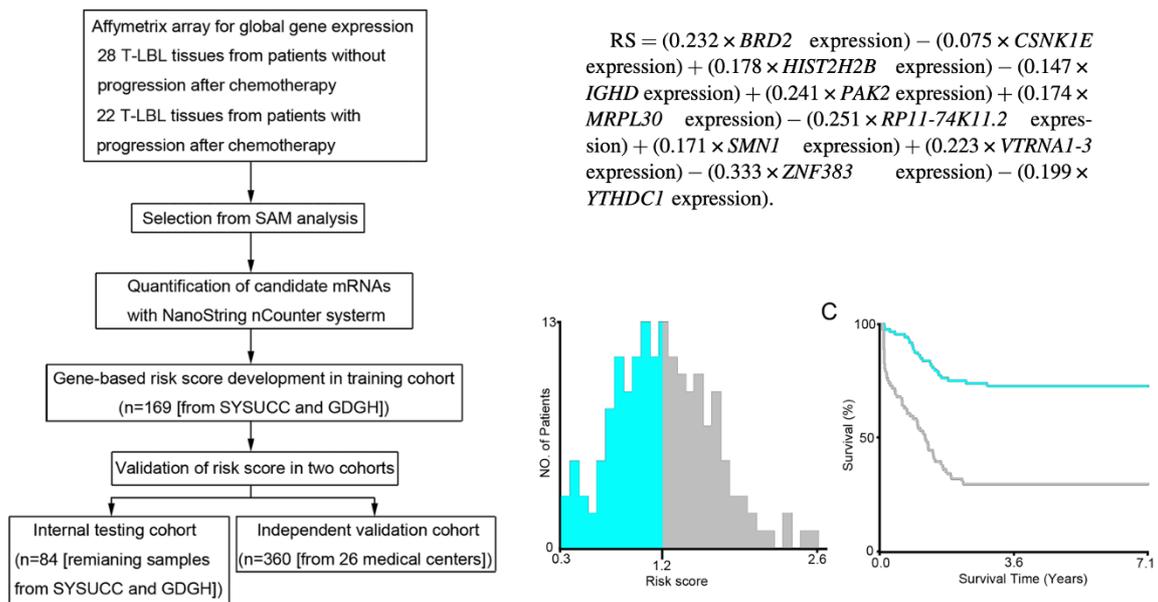


Figure 49 Classifieur Transcriptomique dans les LL-T

Proposition de classifieur transcriptomique dans les lymphomes lymphoblastiques T (LBL-T) sur la base de l'analyse différentielle du profil transcriptomique de 50 LL-T (28 bons répondeurs vs 22 rechuteurs/réfractaires). Définition d'un score intégré de risque (RS, risk score) permettant de diviser les LBL-T en Haut risque et Faible risque sur la base du profil d'expression d'une sélection de 11 gènes (Tian et al., 2020).

Sur le plan de l'analyse du potentiel impact du statut en termes de CNV dans les LAL-T, je réalise actuellement un travail dans le laboratoire qui, à partir de l'analyse réalisée en *Cytoscan HD Affymetrix* chez plus de 300 patients des cohortes FRALLE2000 et GRAALL0305, nous permettra de déterminer l'incidence et l'impact pronostique associés aux altérations de type SNV dans les LAL-T. Il s'agit de la plus grande cohorte de LAL-T explorée par cette technique de très haute résolution pour laquelle nous disposons également d'annotations clinico-biologiques.

Le manuscrit de ce travail est en préparation et les premières analyses nous ont permis de décrire pour la 1^o fois les profils d'altérations différentielles entre les LAL-T adultes et pédiatriques

(Figure 50) mais également de mettre en évidence l'impact pronostique associé avec la présence de certaines altérations non décrites à ce jour pour certaines d'entre elles (Figure 51).

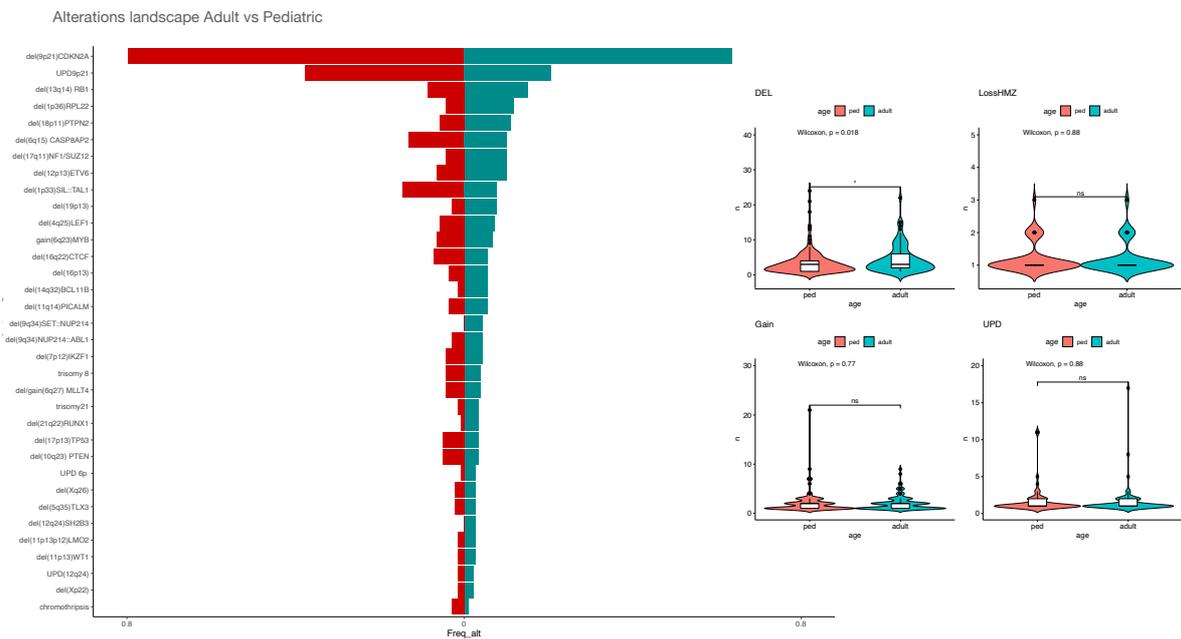


Figure 50 Profil d'altérations en terme *Copy Number Variant* (CNV) dans les LAL-T adultes et pédiatriques dans une cohorte de 307 LAL-T analysées en CytoScan™ HD Array.

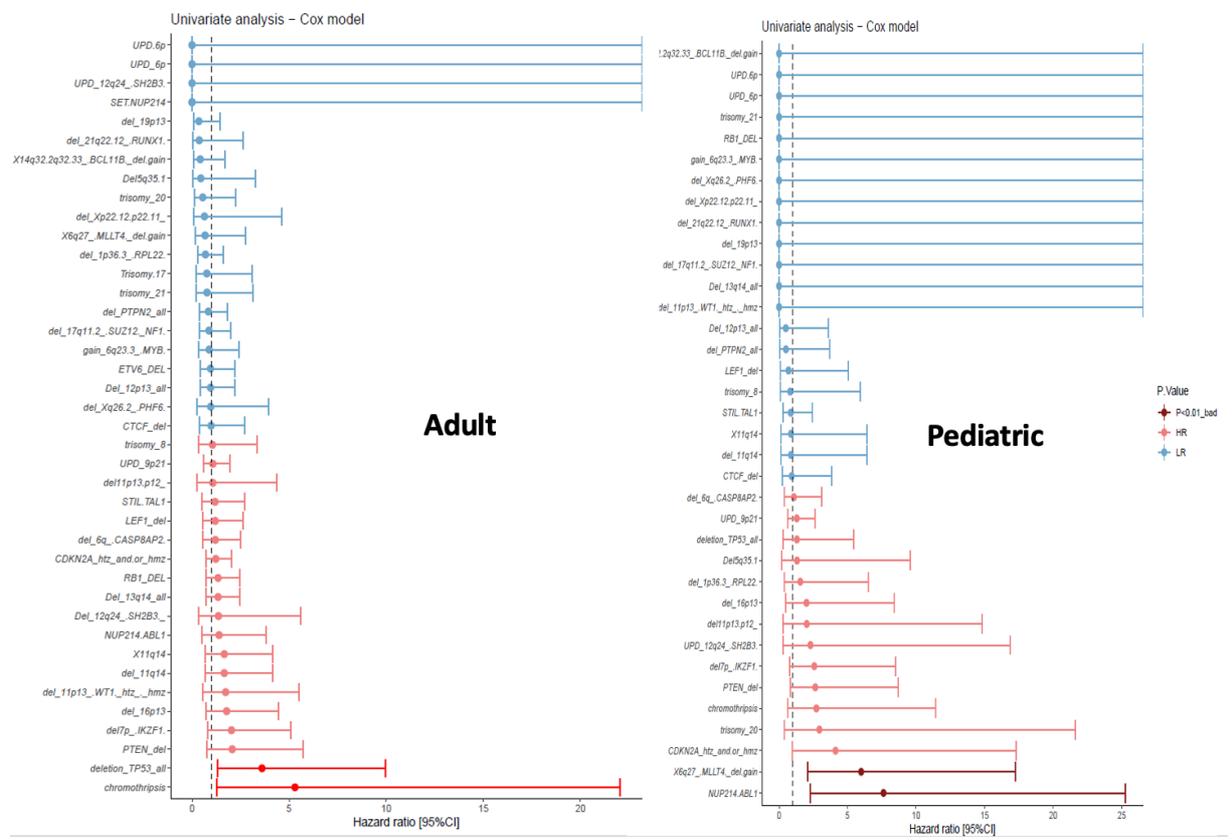


Figure 51 Impact en analyse univarié des altérations de type CNV sur la survie globale dans une cohorte de 307 LAL-T analysées en CytoScan™ HD Array.

Perspective d'intégration des données « omics » grâce à une approche de machine learning

Ainsi, un des enjeux majeurs au cours de la suite de ce projet sera de parvenir à combiner l'ensemble de ces informations afin d'établir un risque « omics » intégré qui prendrait en compte l'exhaustivité des différentes informations générées tant sur le plan mutationnel que transcriptomique, épigénétique et structurelle. Devant la quantité exponentielle des informations à traiter, on comprend que cet objectif d'intégration ne pourra s'envisager que par une approche bio-informatique complexe reposant sur les techniques récentes de traitements des données par machine learning. Ainsi, mon projet de post-doctorat que je réaliserai au sein de l'unité d'épidémiologie oncogénétique du Pr Moorman à l'université de Newcastle, s'articulera autour de cette thématique.

Améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la rechute des LAL-T.

Identifier au diagnostic les patients à risques de rechute sur la base de leurs altérations initiales répond principalement à un objectif de stratification thérapeutique mais n'apporte que peu d'information relative aux mécanismes « driver » de la rechute.

La mise en évidence de ces mécanismes précis doit en effet passer par une analyse comparative entre le paysage mutationnel du diagnostic (D) et celui de la rechute (R), seule approche permettant de mettre en évidence les mutations fondatrices mais également et surtout les mutations acquises à la R.

Dans un travail que je réalise actuellement au laboratoire nous avons analysé près de 130 couples de LAL-T pour lesquels nous disposons des prélèvements au D et à la R. Pour chacun de ces prélèvements nous avons réalisé un NGS pan-exon précédemment présenté, complété par un panel destiné à mettre en évidence certaines altérations spécifiquement acquises à la R comme les mutations de *NT5C2* qui sont associées à une résistance aux inhibiteurs de synthèse des purines. Une étude en parallèle des réarrangements VDJ nous permettra également de préciser les liens entre évolution clonale d'un point de vue mutationnel et évolution du statut clonal en termes de remaniements IgH/TCR.

Les premières analyses nous ont conduit à rapporter que les rechutes de LAL-T peuvent se répartir arbitrairement en 3 groupes selon le délai d'apparition de la rechute ; les rechutes très précoces ou *Very Early Relapse* qui représente 14% des cas de R et surviennent dans les 9 premiers mois post-D, les rechutes précoces ou *Early Relapse* qui sont majoritaires (61% des cas) et surviennent entre 9 et 24 mois et enfin les rechutes tardives (après 24 mois) qui représentent le quart restant (Figure 52). Cette distinction temporelle est cruciale dans le cas des rechutes de LAL-T car d'un point de vue pronostique il est maintenant admis que le délai entre le D et la R constitue un élément pronostic majeur. Les déterminants moléculaires impliqués dans ce différentiel pronostic lié au délai de la rechute ne sont pas connus et seront explorés dans le cadre de ce travail.

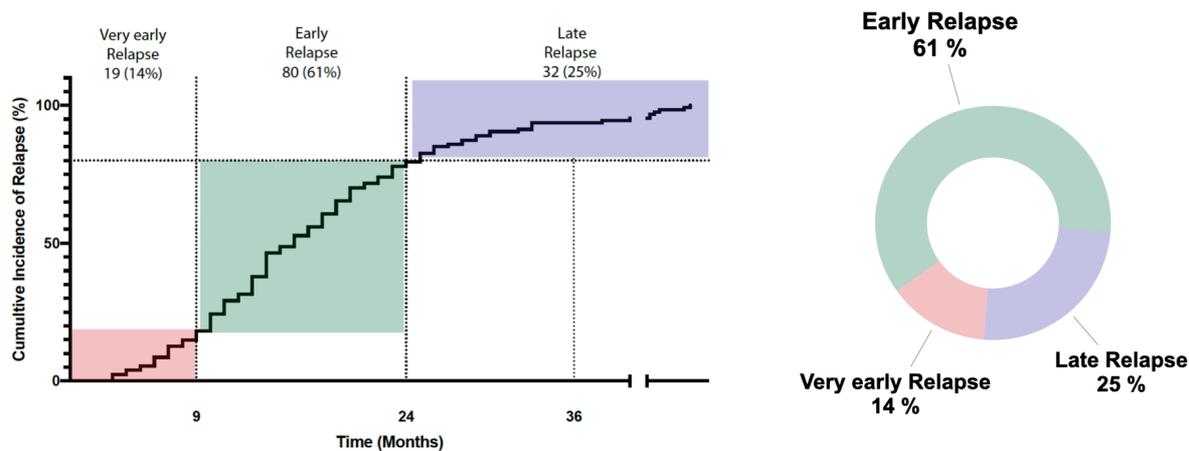


Figure 52 Profil temporel des rechutes de LAL-T au sein de notre cohorte de couples de LAL-T au diagnostic et à la rechute.

L'analyse comparative du paysage mutationnel entre le D et la R de notre cohorte de 131 couples D/R de LAL-T a également permis de mettre en évidence certains profil d'acquisitions et/ou de pertes spécifiques selon les *pathways* impliqués ainsi que certaines co-occurrences mutationnelles spécifiques (Figure 53).

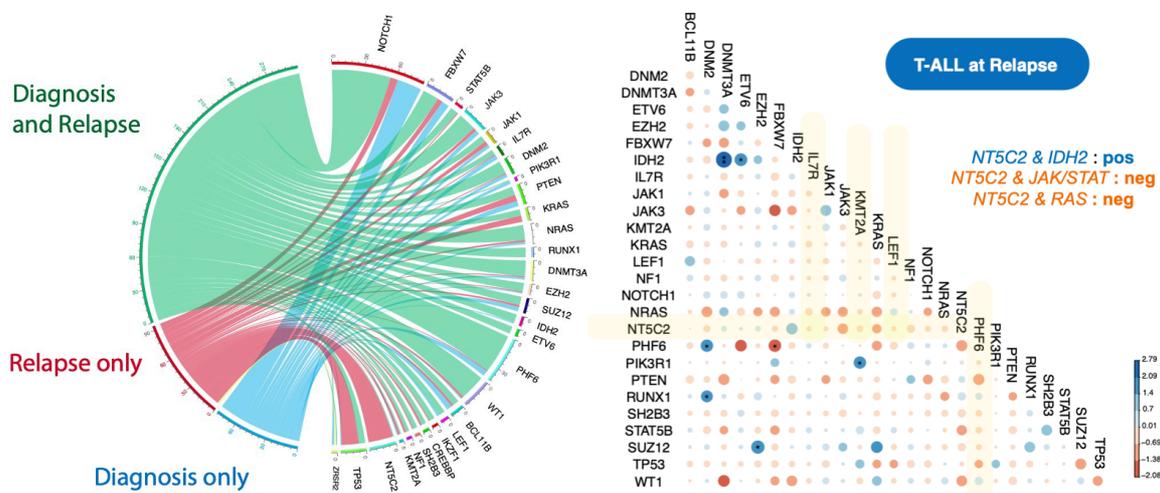


Figure 53 Analyse du profil mutationnel entre le diagnostic (D) et la rechute (R) dans les LAL-T

Le circos plot (à gauche) représente les altérations conservées entre le D et la R (en vert), celles qui sont spécifiquement acquises à la rechute (en rouge) et celles qui sont perdues entre le D et la R. De façon notable on observe que les mutations de *NT5C2* sont quasi-exclusivement acquises au moment de la R, probablement secondaire à l'exposition à la chimiothérapie elle-même responsable de l'acquisition de mutation supplémentaire, tout comme les mutations de *TP53* qui sont très rares au D mais relativement fréquentes à la R (20% des cas environ). Les acquisitions d'anomalies de *K-RAS* sont également fréquentes à la R. A l'inverse les mutations de *NOTCH1* sont très rarement acquises à la R alors qu'elles sont susceptibles de disparaître entre le D et la R dans presque 20% des cas.

Le Corrplot (à droite) permet de visualiser les co-occurrences mutationnelles entre les différentes altérations au moment de la rechute. Ainsi on note une association positive entre les altérations de *NT5C2* et les mutations d'*IDH2*, à l'inverse les anomalies de *NT5C2* sont rarement associées aux altérations de la voie JAK/STAT et de la voie RAS.

L'étude des réarrangements IgH/TCR entre le D et la R permettra également d'affiner notre compréhension de l'évolution clonale entre le D et la R. Ainsi au sein de notre cohorte de 131 couples DR de LAL-T nous disposons du statut IgH/TCR pour 81 patients. L'analyse des réarrangements IgH/TCR entre le D et la R nous a permis de mettre en évidence une majorité de conservation du clone entre le D et la R (73% des cas). De façon intéressante nous avons constaté qu'un nombre significatif de LAL-T à la R pouvaient conserver le même réarrangement IgH/TCR alors que leurs profils mutationnels différaient radicalement du D suggérant l'existence d'une dichotomie entre le profil mutationnel et l'existence d'un remaniement IgH/TCR spécifique (Figure 54).

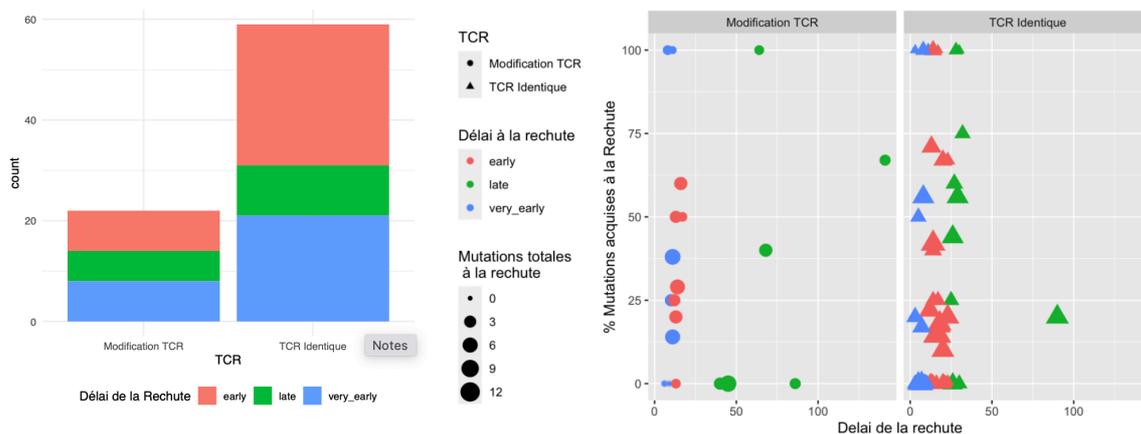


Figure 54 Analyse comparative entre le D et la R du profil de réarrangement IgH/TCR

Cette approche d'analyse comparative entre le D et la R de 131 couples de LAL-T sera prochainement complétée par une approche en single-cell DNA-seq (TAPESTRI™), seule méthode actuelle permettant de dresser le paysage mutationnel à l'échelle unicellulaire. Cette approche nous conduira à explorer avec précision les mécanismes d'acquisition de certaines mutations à la R en permettant d'identifier la présence d'éventuel sous-clone présent au D où acquis spécifiquement à la R.

Par la suite nous analyserons les signatures mutationnelles spécifiques des différents types de R selon le délai à la rechute, nous faisons l'hypothèse que l'exposition à la chimiothérapie pourrait être pourvoyeuse de sélection et d'émergence de sous-clones présents au D mais non détectable par les techniques actuelles. On peut imaginer à terme que l'identification de sous-clone spécifique au D (par exemple porteur d'une mutation de *TP53* ou

de *NT5C2*) pourrait amener à modifier les protocoles de chimiothérapie afin d'éviter d'avoir recours à des drogues connues pour sélectionner les sous-clones porteurs de ce type de mutations.

Approche translationnelle en lien avec la mise en évidence des altérations moléculaires dans les LAL-T.

Le screening moléculaire comme potentiel levier thérapeutique dans les LAL-T.

Dans un premier travail (article 4) nous avons analysé les altérations de *TP53* dans les LAL-T et nous avons mis en évidence, d'une part l'impact pronostique de cette altération au diagnostic mais nous avons également rapporté une sensibilité des LAL-T *TP53^{MUT}* à une drogue récemment mise au point ayant la capacité d'induire une reformation de la protéine p53 mutée et rétablir ainsi l'activité physiologique de p53. De façon notable nous avons également montré que l'activation de *NOTCH1* dans un contexte de LAL-T *TP53^{WT}* induisait des perturbations métaboliques contribuant à sensibiliser les LAL-T à l'activité de l'APR-246, en effet cette molécule présente également une activité indépendante de la restauration de l'activité de p53 et fonctionne comme un inducteur de la ferroptose via la déplétion en glutathion qu'elle induit.

Dans un deuxième travail (article 5) nous avons mis à profit nos résultats ayant conduit à démontrer l'existence d'altérations de la voie *PI3K/AKT* dans les LAL-T comme cible thérapeutique potentielle. L'analyse métabolique des LAL-T présentant une altération de la voie *PI3K/AKT* ont révélé l'existence d'une dépendance à la glycolyse. De façon notable, l'inactivation de cette voie métabolique s'accompagne d'un recours à la glutaminolyse en guise de sauvetage dans les LAL-T *PI3K^{Alt}*. Nous proposons une nouvelle approche thérapeutique s'appuyant sur une double inhibition (à la fois de la glycolyse et de la glutaminolyse) dans les LAL-T *PI3K^{Alt}*. Cette approche de double inhibition glycolyse/glutaminolyse a été également utilisée en clinique chez des patients (n=5) en situation de LAL-T/LBL-T rechuteurs ou réfractaires avec des résultats encourageants justifiant le développement dans le futur de cette approche innovante consistant à proposer un traitement ciblé selon le type d'altérations mise en évidence par les techniques des séquençages.

A l'instar du ciblage de la voie PI3K nous travaillons également à la mise au point d'un ciblage des altérations de la voie IL7 qui sont présentes dans près d'un tiers des LAL-T sous la forme de mutations activatrices de l'*IL7R*, de *STAT5B*, de *JAK1* ou *JAK3* mais également en cas de surexpression du CD127 (IL7R). Sur le plan biologique, le ciblage de cette voie par des inhibiteurs spécifiques de JAK1/2 par le Ruxolitinib, de JAK3 (et dans une moindre mesure

JAK1/2) avec le Tofacitinib en association avec des inhibiteurs de BCL2 (Venetoclax) a montré son efficacité (Degryse et al., 2018; Senkevitch et al., 2018). D'un point de vue clinique, nous avons également rapporté l'efficacité de l'association Tofacitinib-Venetoclax dans une série de 8 patients (Cabannes et al., 2019) avec des réponses également prometteuses.

Au total, la translation des analyses biologiques en propositions thérapeutiques concrètes constitue probablement l'un des grands tournants dans la prise en charge des LAL-T/LBL-T au cours des dernières décennies. Pour la première fois dans cette hémopathie, la mise en évidence de dérégulations spécifiques pourrait conduire à la proposition de thérapies ciblées chez des patients en situation de maladie R/R classiquement devenues résistantes aux protocoles de chimiothérapies habituellement proposés dans ces indications.

L'illustration la plus concrète de la portée translationnelle que peut constituer ces approches d'explorations des altérations moléculaires dans les LAL-T se retrouve dans le projet *ALL-Target* dont la mise en place est actuellement en cours en France. Cette étude permettra pour la première fois d'associer dans la décision thérapeutique des LAL-T/LBL-T en situation R/R les résultats des explorations des altérations oncogéniques en les combinant à ceux d'un « *drug testing* » des principales nouvelles drogues développées dans le champ des LAL-T directement sur les blastes du patient afin de proposer à chaque malade un traitement spécifiquement adapté à son profil d'altération et/ou de réponse *ex vivo* aux nouvelles thérapies.

Dans un troisième travail (article 6) nous avons cherché à expliquer un paradoxe que nous avons mis en évidence au cours d'une première étude en 2009 et qui a été ensuite confirmé à plusieurs reprises. Il s'agit du pronostic favorable associé aux mutations de *NOTCH1* dans les LAL-T. *NOTCH1* est un oncogène majeur dans les LAL-T (plus de 70% d'entre elles présentent des mutations activatrices de *NOTCH1*) et pourtant nous avons précédemment rapporté que la présence de mutations de *NOTCH1* était un facteur de bon pronostic (à la fois dans les LAL-T adultes et pédiatrique, mais également dans les LBL-T adultes et pédiatriques). Dans ce travail, nous nous sommes appuyés sur des analyses en single-cell RNA-seq afin d'identifier les cellules initiatrices de leucémie (LIC) dans les contingents blastiques de LAL-T *NOTCH1/FBXW7* mutés (*N/F^{Mut}*) et *N/F^{WT}*. De façon notable, nous avons montré que la proportion de LIC quiescentes étaient augmentées dans les LAL-T *N/F^{WT}* après exposition à la chimiothérapie. A l'inverse, dans les LAL-T *N/F^{Mut}*, l'activation de NOTCH1 et la régulation positive de c-MYC associée augmente la proportion de LIC en état de prolifération ce qui induit

une majoration de leur chimiosensibilité. Ainsi, après exposition à la chimiothérapie et contrairement aux LAL-T N/F^{WT} , les LAL-T N/F^{Mut} se caractérisent par une réduction massive de leur stock de LIC. Or ces cellules sont considérées comme responsables de l'émergence d'une rechute dans les LAL-T. On comprend ainsi l'intérêt de chercher à cibler les LIC des LAL-T N/F^{WT} .

Alors que la totalité des essais cliniques actuels se concentrent sur la recherche d'un inhibiteur de NOTCH1 (Cordo' et al., 2021), nous proposons une approche opposée. En effet, nous soutenons que l'activation de NOTCH1 se comporte comme un inducteur de chimiosensibilité conduisant à une réduction du risque de rechute grâce à l'éradication des LIC au cours des premières phases de traitement. Une approche innovante et en rupture avec les concepts actuels serait d'induire une activation de la voie NOTCH1 dans les LAL-T N/F^{WT} en association avec la chimiothérapie d'induction. En activant NOTCH1 les LIC N/F^{WT} seraient mises en cycle via l'activation de c-MYC, cet état pro-prolifératif devrait conduire à augmenter leur sensibilité aux drogues cytotoxiques qui sont principalement utilisées dans les protocoles de chimiothérapies actuelles, l'éradication de ces LIC N/F^{WT} devrait *in fine* s'accompagner d'une diminution de l'incidence des rechutes. Le challenge actuel consiste à explorer *in vitro* dans un premier temps la faisabilité d'une activation de la voie NOTCH1. A cette fin certaines molécules ont été rapportées comme possédant de propriétés d'induction de NOTCH1 ou de c-MYC comme l'acide valproïque comme activateur de la voie NOTCH1 (Greenblatt et al., 2008) ou l'utilisation de lithium comme inhibiteur de la GSK-3 β , lui-même étant un médiateur de la dégradation de c-MYC (Harrington et al., 2019). Une autre approche, plus ambitieuse et que nous souhaitons également réaliser, serait de développer des nanoparticules permettant de délivrer aux cellules blastiques, le ligand de NOTCH1 ; DLL4 afin d'induire une activation supra-physiologique de la voie NOTCH1 dans les LAL-T N/F^{WT} et comparer leur chimiosensibilité et la proportion de LIC quiescentes après exposition à la chimiothérapie par rapport à un même groupe de LAL-T N/F^{WT} non exposées à une stimulation de la voie NOTCH1.

Depuis la mise en évidence de son incidence élevée dans les LAL-T, l'activation dérégulée de la voie NOTCH1 a été considérée comme un évènement oncogénique majeur dans le processus d'oncogenèse de ces hémopathies. Si son rôle dans le développement des LAL-T est maintenant admis et bien démontré, en revanche l'analyse de son impact en situation d'exposition à la chimiothérapie n'a jamais été exploré au-delà des études cliniques de corrélations pronostiques. Dans ce travail, nous illustrons comment un oncogène majeur peut

également constituer un talon d'Achille tumoral devenant un levier thérapeutique dans les LAL-T. Par l'induction de la ferroptose et la sensibilité à l'APR-246 qui en découle mais également par l'activation du cycle cellulaire et la majoration de la sensibilité à la chimiothérapie associée, l'activation de NOTCH1 pourrait constituer à la fois une des forces mais peut être aussi la plus grande des faiblesses des LAL-T.

En conclusion, nous proposons de revisiter le paradigme largement admis en oncologie qui repose sur la recherche systématique d'une inhibition d'un oncogène dérégulé. Nous soutenons l'intérêt de s'appuyer sur les fragilités induites par cet oncogène, car bien qu'au demeurant indispensable au processus de développement tumoral initial, ce dernier peut également conférer une grande fragilité à la cellule tumorale. Au cours de ce travail nous avons montré que cette fragilité « oncogène-induite » pouvait être exploitée en pratique clinique et offrir ainsi de nouvelles pistes thérapeutiques pour ces pathologies dont le pronostic demeure particulièrement péjoratif.

Annexes

Annexe 1) Exploration des altérations de *PTPN2* dans les LAL-T

I. Présentation du travail : Impact des anomalies de *PTPN2* dans les LAL-T

Au cours de ce travail publié en 2019 dans *Blood Advances*, nous nous sommes intéressés aux altérations du gène *PTPN2* dans les LAL-T. *PTPN2* (*Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2*) code pour une tyrosine phosphatase qui participe à la régulation du signal TCR via la déphosphorylation des différentes protéines effectrices impliquées dans la transduction du signal TCR telles que Src, Fyn, Lck mais également de STAT1-3-5-6 et JAK1-3. *PTPN2* se comporterait donc comme un suppresseur de tumeur. Il est donc cohérent que la majorité des altérations de *PTPN2* correspondent à des délétions.

Nous avons utilisé une approche par MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) pour rechercher les délétions de *PTPN2*. Avec cette approche nous avons mis en évidence 8% de délétion de *PTPN2* au sein d'une cohorte de 430 patients (216 adultes et 214 enfants). Les altérations de *PTPN2* étaient associées aux LAL-T $\alpha\beta$ et TLX1^{pos}. Sur le plan des co-occurrences mutationnelles, les délétions de *PTPN2* étaient associées aux altérations de la voie IL7R/JAK/STAT. De façon notable nous avons également retrouvé que les délétions de *PTPN2* et celle de *PTEN* étaient mutuellement exclusive.

D'un point de vue clinique les délétions de *PTPN2* étaient associées à une augmentation de la corticosensibilité et une tendance vers une augmentation de la survie globale dans la population pédiatrique avec notamment une incidence de rechute cumulée diminuée dans le groupe *PTPN2*^{Del} vs *PTPN2*^{WT} (8% vs 26%, $p = .177$).

Article VII

Titre :

Clinical and biological features of PTPN2 deleted adult and pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia

Co-auteurs :

Marion Alcantara, **Mathieu Simonin**, Ludovic Lhermitte, Aurore Touzart, Marie Emilie Dourthe, Mehdi Latiri, Nathalie Grardel, Jean Michel Cayuela, Yves Chalandon, Carlos Graux, Hervé Dombret, Norbert Ifrah, Arnaud Petit, Elizabeth Macintyre, André Baruchel, Nicolas Boissel, Vahid Asnafi.

État de article :

Publié

Nom de la revue :

Blood Advances

Année de Publication :

2019

Clinical and biological features of PTPN2-deleted adult and pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia

Marion Alcantara,¹ Mathieu Simonin,¹⁻³ Ludovic Lhermitte,¹ Aurore Touzart,¹ Marie Emilie Dourthe,^{1,4} Mehdi Latiri,¹ Nathalie Grardel,⁵ Jean Michel Cayuela,⁶ Yves Chalandon,⁷ Carlos Graux,⁸ Hervé Dombret,⁹ Norbert Ifrah,¹⁰ Arnaud Petit,^{2,3} Elizabeth Macintyre,¹ André Baruchel,⁴ Nicolas Boissel,⁹ and Vahid Asnafi¹

¹Université Paris Descartes Sorbonne Cité, Institut Necker-Enfants Malades, Institut National de Recherche Médicale U1151, Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker Enfants-Malades, Paris, France; ²Department of Pediatric Hematology and Oncology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier des Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Armand Trousseau Hospital, Paris, France; ³Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie Université Paris 06, Unité Mixte de Recherche S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Groupe de Recherche (GRC) Clinique n°07, GRC Myéloproliférations aiguës et chroniques, Paris, France; ⁴Department of Pediatric Hematology and Immunology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Universitaire Robert-Debré, Paris, France; ⁵Laboratory of Hematology, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France; ⁶Laboratory of Hematology, Saint-Louis Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁷Swiss Group for Clinical Cancer Research, Bern, Hôpital Universitaire, Geneva, Switzerland; ⁸Université Catholique de Louvain, Centre Hospitalier Universitaire, Namur, Yvoir, Belgium; ⁹Adolescent and Young Adult Hematology Unit, Saint-Louis Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; and ¹⁰Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers, France

Key Points

- We provide a comprehensive analysis of PTPN2-associated genomic alterations and clinical implications in a large cohort of T-ALL.
- PTPN2 loss associates with mutations in the IL7R/JAK-STAT signaling pathway, PHF6 and WT1, but is exclusive from PTEN deletions.

Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2 (PTPN2) is a phosphatase known to be a tumor suppressor gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Because the full clinicobiologic characteristics of PTPN2 loss remain poorly reported, we aimed to provide a comprehensive analysis of PTPN2 deletions within a cohort of 430 patients, including 216 adults and 214 children treated according to the GRAALL03/05 (#NCT00222027 and #NCT00327678) and the FRALLE2000 protocols, respectively. We used multiplex ligation-dependent probe amplification to identify an 8% incidence of PTPN2 deletion, which was comparable in adult (9%) and pediatric (6%) populations. PTPN2 deletions were significantly associated with an $\alpha\beta$ lineage and TLX1 deregulation. Analysis of the mutational genotype of adult T-ALL revealed a positive correlation between PTPN2 deletions and gain-of-function alterations in the IL7R/JAK-STAT signaling pathway as well as PHF6 and WT1 mutations. Of note, PTPN2 and PTEN (phosphatase and tensin homolog) deletions were mutually exclusive. Regarding treatment response, PTPN2-deleted T-ALLs were associated with a higher glucocorticoid response and a trend for improved survival in children, but not in adults, with a 5-year cumulative incidence of relapse of 8% for PTPN2-deleted pediatric cases vs 26% ($P = .177$).

Introduction

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is an uncommon, aggressive neoplasm that accounts for ~25% and 10% of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemias, respectively.^{1,2} T-ALL derives from the clonal transformation and proliferation of lymphoid progenitors with thymic stage of maturation arrest.^{3,4} Cytogenetic and global transcriptomic analyses led to the classification of T-ALL into molecular groups characterized by abnormal expression of specific transcription factors (TAL, LMO1/2, TLX1/3, LYL, HOXA, MEF2C) and a specific stage of differentiation blockade.^{3,5,6} Across all these subgroups, a number of additional recurrent genetic abnormalities are found, including the loss of major tumor

Submitted 20 November 2018; accepted 6 May 2019. DOI 10.1182/bloodadvances.2018028993.

For original data, please contact vahid.asnafi@aphp.fr. Supplemental data provide additional information regarding clinical trials (supplemental Tables 1 and 2;

supplemental Figure 1), microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH), and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction.

The full-text version of this article contains a data supplement.

© 2019 by The American Society of Hematology

suppressive pathways such as inactivating alterations of PTEN and CDKN2A and activation of oncogenic pathways (eg, activating mutations in NOTCH1, IL7R/JAK).⁶

Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 (PTPN2; also known as TC-PTP) is another tumor suppressor gene described to be inactivated in T-ALL.⁷⁻⁹ It is a ubiquitous nontransmembrane tyrosine phosphatase whose substrates include various receptor tyrosine kinases, such as the epidermal growth factor receptor, the platelet-derived growth factor receptor β , and the hepatocyte growth factor receptor.¹⁰⁻¹² Moreover, PTPN2 is involved in hematopoietic development and regulation of T-cell activation through the dephosphorylation of c-Src, Fyn, Lck, JAK-1-3, and STAT-1,-3,-5, and -6.¹³⁻¹⁷

In 2011, Kleppe et al¹⁸ identified biallelic inactivation of PTPN2 in 2 out of 39 cases of peripheral T-cell lymphoma "not otherwise specified," but none in a cohort of 50 cases of Hodgkin lymphoma. They also identified biallelic inactivation of PTPN2 in the Hodgkin lymphoma cell line, SUP-HD1, which was associated with activation of the JAK/STAT pathway.

PTPN2 deletions have been described in up to 6% of combined adult and pediatric T-ALLs,^{7,8} almost exclusively in cases with abnormal expression of the TLX1 transcription factor. Furthermore, PTPN2 loss seems to be associated with the presence of NUP214-ABL1, because PTPN2 negatively regulates this fusion oncogene.⁷ PTPN2 deletion also cooperates with JAK-1/3, increasing the effects of their oncogenic mutations by increasing cytokine sensitivity and JAK-STAT signaling, thus promoting leukemic cell proliferation.^{8,19}

Nevertheless, data regarding the incidence and clinical impact of PTPN2 deletions in large and unbiased T-ALL patient cohorts are lacking. In this study, we aimed to provide a comprehensive analysis of the clinical characteristics, the prognosis, and the genomic landscape of adult and pediatric PTPN2-deleted patients within a consecutive series of 430 T-ALL treated within the French adult (GRAALL03/05; $n = 216$) and pediatric (FRALLE2000; $n = 214$) prospective clinical trials.

Patients and methods

Clinical trials

Adult patients (16 to 59 years old) were included in the GRAALL03/05 trials, which were registered at clinicaltrials.gov (GRAALL-2003, #NCT00222027; GRAALL-2005, #NCT00327678). Pediatric patients (1 to 20 years old) were treated in 10 French pediatric hematology departments, members of the FRALLE study group, according to the FRALLE 2000 T guidelines, a German BFM-inspired protocol.²⁰ Patients aged from 16 to 20 years were either treated in the GRAALL (22/216 patients, 10%) or in the FRALLE protocol (12/214 patients, 5.6%) according to the initial health care center (either adult or pediatric departments). Studies were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by local and multicenter research ethical committees.

Immunophenotypic and molecular characterization of T-ALL samples

Diagnostic T-ALL samples were analyzed for immunophenotype, fusion transcripts (SIL-TAL1, CALM-AF10, NUP214-ABL, MLL), oncogenic transcripts (TLX1 and TLX3), T-cell receptor (TCR)

rearrangements, and NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN mutations, as previously described.^{4,21-23}

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis

MLPA analysis was performed using the MRC Holland (Amsterdam, The Netherlands) SALSA MLPA probe mix P383-A1 TALL according to the manufacturer's recommendations. Polymerase chain reaction products were separated by capillary electrophoresis on an ABI-3130 device. Coffalyser software, available at <http://www.mlpa.com>, was used for the analysis.

Next-generation sequencing

A custom capture Nextera XT gene panel (Illumina) targeting complete coding exons and their adjacent splice junctions of 78 genes was designed based on targets known to be mutated in T-ALL and/or important in T lymphopoiesis. DNA Libraries were prepared using Nextera Rapid Capture Enrichment and underwent 2×150 -bp paired-end sequencing on an Illumina MiSeq sequencing system with MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). Briefly, sequence reads were filtered and mapped to the human genome (GRCh37/hg19) using in-house software (Polyweb; Institut Imagine, Paris, France). Annotated variants were filtered according to the following criteria: (1) coverage $< 30\times$, < 10 alternative reads, and variant allelic fraction $< 7\%$ were filtered out; (2) polymorphisms described in dbSNP, 1000Genomes, EVS, Gnomad, and EXAC with a calculated mean population frequency $> 0.1\%$ were removed; and (3) nonfiltered variants were annotated using somatic database COSMIC and ProteinPaint (St. Jude Children's Research Hospital–Pediatric Cancer data portal), published data, and in silico predictions.

Statistical analysis

Group comparison for categorical and continuous variables was performed with Fisher's exact and Mann-Whitney U tests, respectively. The cumulative incidence of relapse (CIR) was calculated from complete remission to relapse date, censoring patients alive without relapse at last follow-up. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis to the last follow-up date by censoring living patients. Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method, and the curves were compared using the log-rank test. Statistical analysis was performed with Stata software, version 12 (StataCorp, College Station, TX). All P values were 2-sided, with $P < .05$ considered statistically significant.

Results

PTPN2 deletion incidence in T-ALL

A total of 430 T-ALL was screened for PTPN2 deletions by MLPA analysis. Two hundred sixteen adult patients and 214 pediatric patients were prospectively treated in the GRAALL-2003-2005 and the FRALLE-2000 protocols, respectively. The incidence of PTPN2 deletions in the whole cohort was 8% (33 patients, 48% monoallelic, 52% biallelic), in line with published data^{7,8,24} (Table 1). No significant difference was observed between adult and pediatric T-ALLs, as we identified PTPN2 deletions in 9% of adult patients (50% monoallelic and 50% biallelic; supplemental Tables 3 and 4) and 6% of the pediatric population (46% monoallelic and 54% biallelic; supplemental

Table 1. Clinicobiologic characteristics of adult and pediatric patients with T-ALL (GRAALL and FRALLE protocols) according to PTPN2 status

	PTPN2 del, n = 33 (8%)*	PTPN2 WT, n = 397 (92%)	Total, N = 430 (100%)	P
Clinical subsets analyzed				
Male, n (%)	22/33 (67)	306/397 (77)	328/430 (76)	.2
Age, median (range), y	27.4 (4.3-57.0)	16.8 (1.1-59.1)	17.5 (1.1-59.1)	.02
WBC, median (range)	48.1 (4.1-574)	57.8 (0.3-980)	57.7 (0.3-980)	.2
CNS involvement (%)	5/33 (15)	37/394 (9)	42/427 (10)	.3
TCR status (available)†	26/33	277/397	303/430	
Immature (IM0, IMD, IMG), n (%)	2/26 (8)	64/277 (23)	66/303 (22)	.08
αβ lineage (IMB, pre-αβ, TCR αβ), n (%)	23/26 (88)	174/277 (63)	197/303 (65)	.009
γδ lineage (TCR γδ), n (%)	1/26 (4)	39/277 (14)	40/303 (13)	.2
Oncogenetics, n (%)†				
TLX1	13/27 (48)	39/308 (13)	52/335 (15)	<.0001
TLX3	9/27 (33)	52/308 (17)	61/335 (18)	.06
SIL-TAL1	1/27 (4)	37/308 (18)	38/335 (17)	.3
NUP214-ABL	5/24 (21)	17/257 (7)	22/281 (8)	.03
PTEN-deleted/mutated	0/33 (0)	55/396 (14)	55/429 (13)	.01
NOTCH1/FBXW7 mutated	28/33 (85)	250/397 (63)	278/430 (65)	.01
RAS mutated	3/33 (9)	36/397 (9)	39/430 (9)	1
Treatment response, n (%)†				
Corticosensitivity	25/32 (78)	217/388 (56)	242/420 (58)	.015
CR	32/33 (97)	374/397 (94)	406/430 (94)	1
MRD1 ≥ 10 ⁻⁴ ‡	9/20 (45)	102/274 (37)	111/294 (38)	.5

Comparison of the clinicobiologic characteristics of PTPN2-deleted and wild-type T-ALL patients in the whole cohort. TCR status and oncogenetics were determined as previously described.^{4,21,23} Bold *P* values are statistically significant (*P* < .05).

CNS, central nervous system; CR, complete remission; del, deleted; IM0, no TCR rearrangement; IMB, VDJ rearrangement of TCRβ is observed; IMD, only TCRδ rearrangement is observed; IMG, both TCRδ and TCRγ rearrangements are observed; WBC, white blood cell count; WT, wild-type.

*Monoallelic 16/33; biallelic 17/33.

†Detailed data in supplemental Figure 3.

‡MRD was centrally assessed by real-time quantitative allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction and interpreted according to EuroMRD group guidelines.^{34,35}

Tables 5 and 6). High-resolution array CGH was performed for a subset of 88 of the 430 patients analyzed by MLPA (supplemental Figure 2) and identified 7 PTPN2 deletions all also identified by MLPA analysis. These deletions encompassed the entire gene (Figure 1A), and all were also found by MLPA (Figure 1B). PTPN2-deleted patients had significantly lower messenger RNA (mRNA) expression than those with no alteration of PTPN2 copy number (Figure 1C). No significant difference was seen in mRNA expression levels between samples with monoallelic or biallelic deletion of PTPN2 (data not shown).

PTPN2 deletions associate with IL7R/JAK-STAT mutations and are mutually exclusive from PTEN deletions/mutations

Regarding oncogenetics features, we confirmed the significant association between PTPN2 deletions and TLX1 expression as well as NUP214-ABL fusion^{7,8} (Table 1; supplemental Figure 3). Indeed, 48% and 21% of PTPN2-deleted T-ALLs expressed TLX1 and NUP214-ABL, respectively, vs 13% and 7% of cases with wild-type PTPN2. In line with these observations, a strong association of PTPN2 deletions with the αβ lineage TCR status of T-ALL was observed (*P* = .009; Table 1). In contrast to published data, not all

PTPN2-deleted patients expressed TLX1/3 because at least 11 cases were TLX1/3 negative (Table 1).

Interestingly, in this large cohort of 430 patients, all PTEN abnormalities were restricted to PTPN2 wild-type patients (*P* = .01; Table 1; Figure 2). Moreover, 85% of the PTPN2-deleted population presented mutations of NOTCH1/FBXW7 vs 63% of wild-type patients (*P* = .01; Table 1).

We then took advantage of our published next-generation sequencing data from 194 of the 216 adult patients included in this study.²⁵ Among those 194 patients, 19 harbored PTPN2 deletions. Overall, at least 1 mutation was detected in 19/19 PTPN2-deleted T-ALL and 173/175 wild-type patients. The comparison of the mutation and large deletion frequencies between PTPN2-deleted and wild-type patients is shown in Figure 2, with a focus on alterations presented by at least 5% of the whole cohort. Data regarding all the abnormalities are reported in supplemental Table 7.

A significant association between mutations in IL7R/JAK-STAT signaling pathway (including DNM2, SH2B3, STAT5B, IL7R, JAK3, JAK1) and PTPN2 deletions was observed. Indeed, mutations in the IL7R/JAK-STAT pathway were found in 14/19 (74%) of PTPN2-deleted T-ALL vs 72/175 (41%) of the wild-type cohort (*P* = .008) (Figure 2; supplemental Tables 8 and 9). A higher rate of PHF6 mutations, with 95% of mutations among PTPN2-deleted

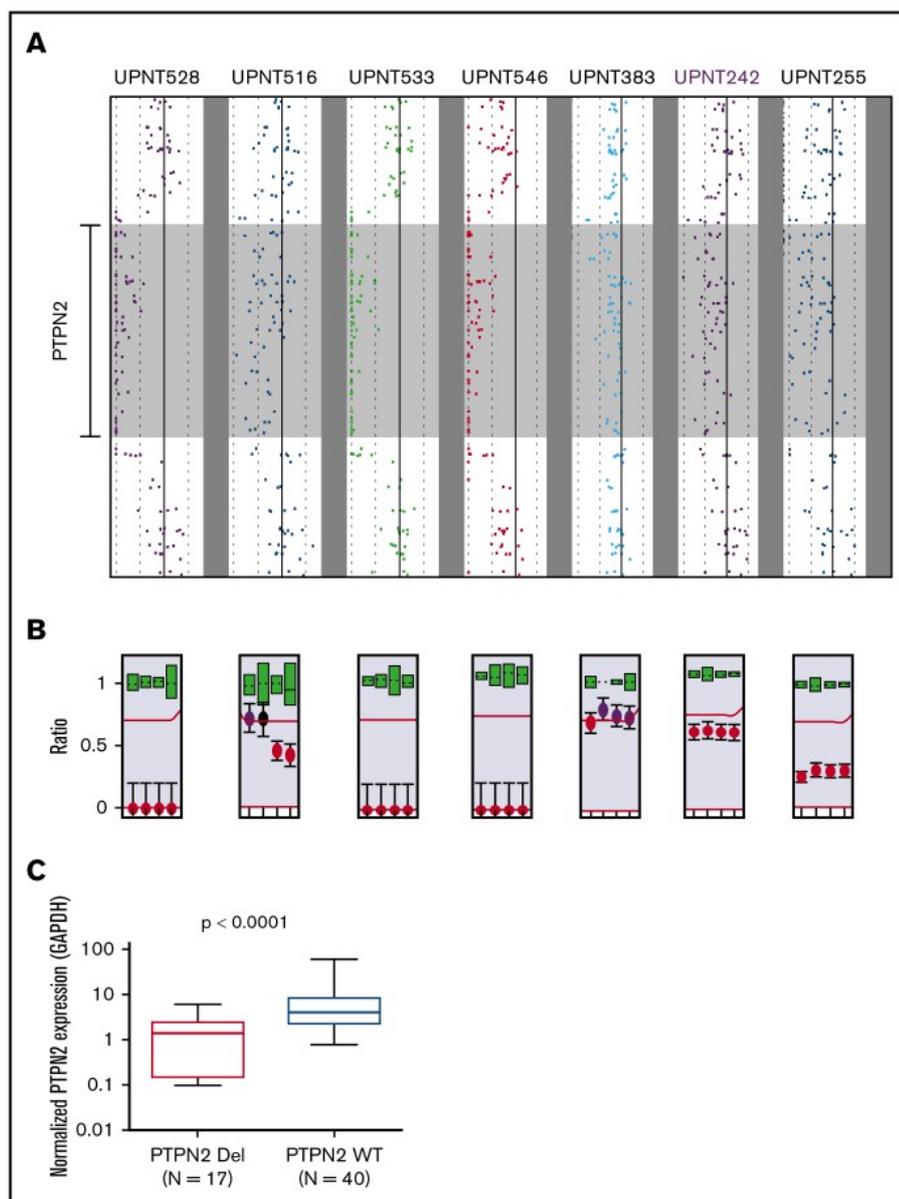


Figure 1. PTPN2 alterations. (A) PTPN2 deletions as identified by array CGH. Seven patients harboring deletions of the entire PTPN2 locus are represented. (B) Corresponding MLPA analyses. Patients UPNT516, UPNT383, UPNT242, and UPNT255 show monoallelic deletion of PTPN2, whereas patients UPNT528, UPNT533, and UPNT546 demonstrate biallelic deletions. (C) Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of PTPN2 expression in T-ALL cases with (Del) or without (WT) PTPN2 deletion. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

patients vs 41% within the PTPN2 wild-type group, was also observed ($P < .0001$) (Figure 2; supplemental Table 8). Moreover, PTPN2 deletions and WT1 mutations were significantly associated, because 26% of PTPN2-deleted adults presented with WT1 mutations vs 10% among PTPN2 wild-type T-ALL ($P = .047$) (Figure 2; supplemental Table 8). Conversely, none of the analyzed pathways was mutually exclusive from PTPN2 deletions except PTEN deletions/mutations.

Prognostic impact of PTPN2 deletions in adult and pediatric patients

Among the entire cohort, the median age of PTPN2-deleted patients was 27.4 years, significantly older than wild-type patients (Table 1; supplemental Figure 4). There was no statistically significant difference regarding the main other clinical characteristics analyzed.

Despite this, the treatment response differed between the 2 groups because the corticosenitivity rate was higher among PTPN2-deleted (25/32, 78%) than wild-type patients (217/388 [56%]; Table 1). Complete remission and minimal residual disease (MRD) rates were not significantly different (Table 1).

In adults, we observed no significant differences in either 5-year CIR (deleted PTPN2, 32%; 95% confidence interval [CI], 16% to 59% vs wild-type PTPN2, 30%; 95% CI, 24% to 37%; $P = .988$) or 5-year OS (deleted PTPN2, 62%; 95% CI, 36% to 80% vs wild-type PTPN2, 66%; 95% CI, 59% to 73%; $P = .843$) (Figure 3A,C).

In contrast, we noted a trend in better survival in the pediatric population. Indeed, 5-year CIR was 8% (95% CI, 1% to 43%) among PTPN2-deleted pediatric patients vs 26% (95% CI, 20% to 33%; $P = .177$), and 5-year OS was 92% (95% CI, 54% to 99%)

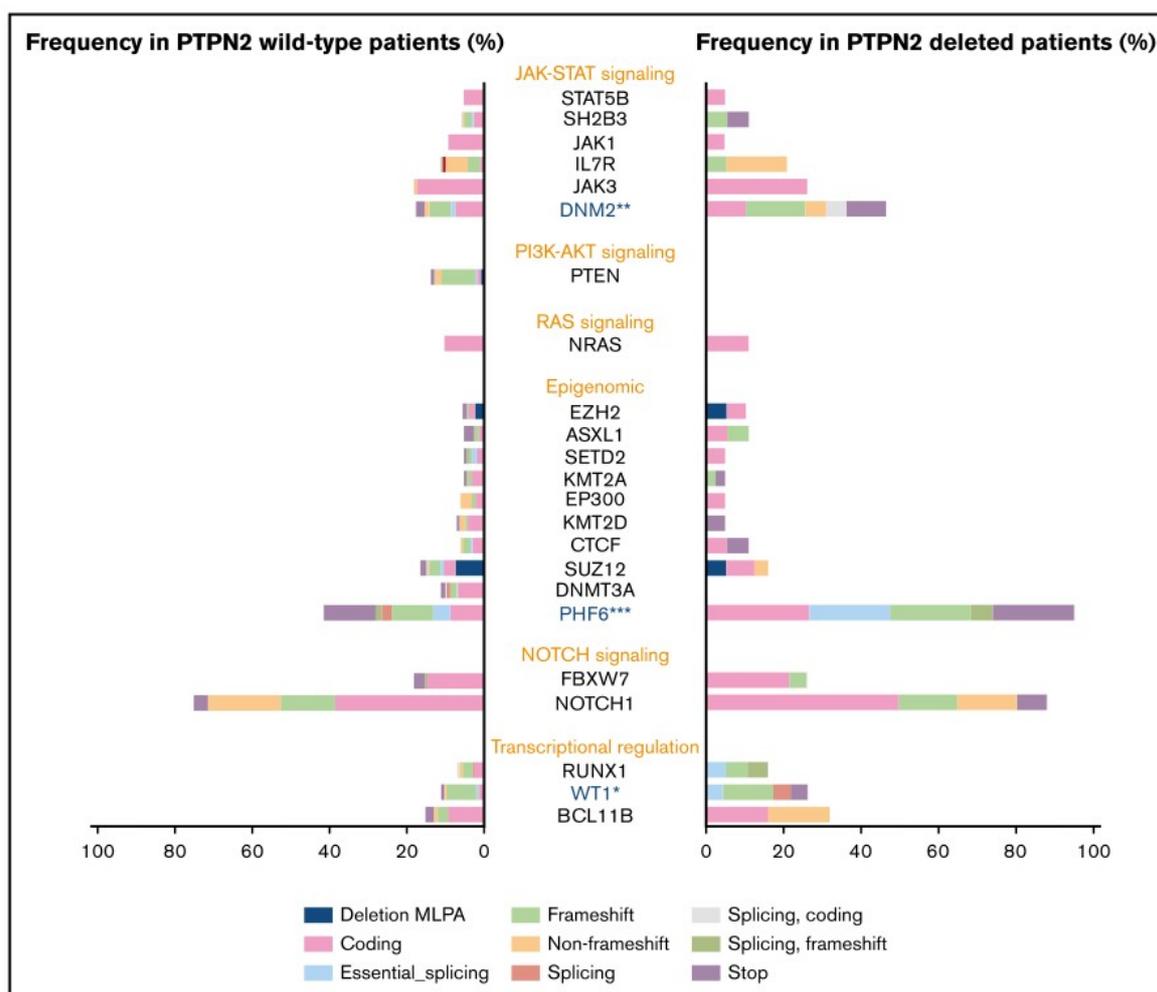


Figure 2. Genetic profile of PTPN2-deleted adult T-ALL. Comparison of the mutational genotypes and large deletions of adult PTPN2-deleted (N = 19) and wild-type adult T-ALLs (N = 175), with a focus on alterations found in at least 5% of the whole cohort. Percentage frequencies in each group are indicated. Mutations are color coded according to type, as depicted. Genes are grouped by functional categories. * $P < .05$; ** $P = .004$; *** $P < .0001$.

among PTPN2-deleted cases vs 78% (95% CI, 71% to 83%; $P = .234$) (Figure 3B,D). Altogether, these data suggest that PTPN2 deletions are not associated with poor outcome in either adult or pediatric T-ALL.

Discussion

This study provided a comprehensive analysis of PTPN2 deletions in a fully characterized cohort of 430 T-ALL patients. The previously described 8% incidence of deletions of the entire PTPN2 locus was confirmed,^{7,8,24} but we observed that deletion rates are similar in the adult and pediatric populations, in contrast to a previous study reporting a higher prevalence of PTPN2 alterations in adults.²⁴ This discrepancy is likely explained by the larger size of the adult cohort reported here.

The equilibrium between protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases is essential for normal cellular signaling, and this balance is often disrupted in cancer.²⁶ PTPN2 is a phosphatase whose loss sensitizes the leukemic cells to cytokine stimulation, thus supporting T-ALL proliferation through the activation of

multiple cytokine receptor pathways, such as JAK-STAT.^{7,8,19} In line with this, we report a significant association between PTPN2 deletions and mutations in the IL7R/JAK-STAT signaling pathway, especially DNM2. DNM2 is a GTPase involved in clathrin-dependent endocytosis.²⁷ The role of DNM2 loss-of-function mutations in T-ALL has recently been deciphered²⁸ with DNM2 mutations impairing IL7R endocytosis and increasing cell surface receptor expression. As such, DNM2 mutations enhance interleukin-7 signaling and could have an additive effect to PTPN2 deletions in promoting T-ALL progression.

Kleppe et al have identified NUP214-ABL kinase as a substrate of PTPN2⁷ and have demonstrated in vitro oncogenic synergy between NUP214-ABL expression and PTPN2 downregulation. Our data are consistent with these observations, because we observed a significant association of PTPN2 deletions with the NUP214-ABL fusion protein in T-ALL. In addition, Vicente et al have reported a significant association between epigenetic regulators, including PRC2, WT1, and PHF6, and mutations in the IL7R/JAK-STAT pathway.²⁴ Our data are partly concordant with this observation because we found a strong

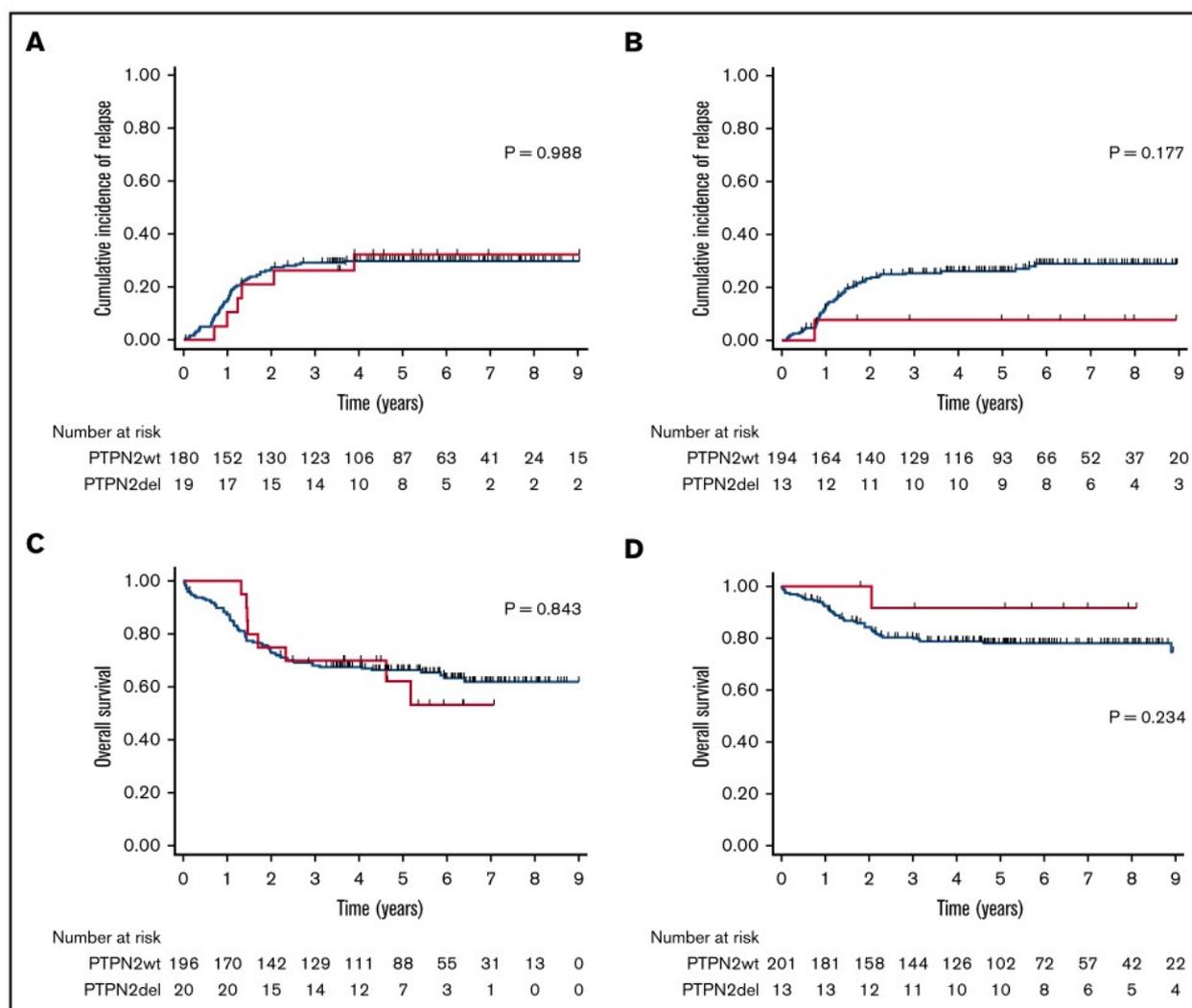


Figure 3. Survival according to PTPN2 status. CIR in the adult (A) and pediatric (B) cohort. OS in the adult (C) and pediatric (D) cohort. Red curves represent PTPN2-deleted T-ALL, and blue curves indicate PTPN2 wild-type patients. *P* values are indicated.

association between PHF6 and PTPN2 mutations and, to a lesser extent, WT1 and PTPN2 mutations, but we did not detect any significant correlation between mutations of the PRC2 complex and PTPN2.

To date, most of PTPN2-deleted T-ALL cases have been identified among TLX1- or TLX3-positive subgroups.^{7-9,24} We confirm the significant association between PTPN2 deletions and TLX1 expression in both the adult and the pediatric cohorts. These findings are also in line with previously described associations between DNM2 and PHF6 alterations and TLX1/TLX3 overexpression.^{9,29}

Interestingly, PTPN2-deleted T-ALL patients show a highly significant association with the $\alpha\beta$ lineage TCR status. This is in contrast to data from Wiede et al, who developed genetic and pharmacologic murine models of PTPN2 inactivation to demonstrate that PTPN2 deficiency promotes $\gamma\delta$ T-cell growth in an LCK- and STAT5-dependent manner.³⁰ One may hypothesize either that PTPN2 deletion may have different consequences depending on the oncogenic context or that murine models have their limits.

Alternatively, these data could suggest that PTPN2 is a candidate for an $\alpha\beta$ lineage differentiation arrest of thymic maturation.

PTEN is the most commonly inactivated phosphatase in T-ALLs, accounting for ~10% to 15% of cases. Its loss of function drives leukemogenesis.³¹ Large deletions and mutations within the exon 7 hot spot are known to impact prognosis.³² Thus, we wondered about the cooccurrence of both PTPN2 and PTEN deletions. Importantly, we observed no PTEN alteration among the patients with PTPN2 deletions. This observation was independent of age, because it was noted in both adult and pediatric patients. We hypothesize that PTEN and PTPN2 pathways could be functionally incompatible, as recently demonstrated for TAL1 and IL7R/JAK-STAT signaling cascades.³³ Functional experiments are needed to understand the mutual exclusion of these 2 phosphatase alterations in T-ALL.

To date, the clinical impact of PTPN2 deletions is unknown. Our study reveals that PTPN2 deletions tend to associate with an improved CIR and OS in the pediatric cohort. Because survival data were only available for 13 PTPN2-deleted pediatric T-ALL, this

study may not be powered to identify a significant difference. On the contrary, we did not observe any survival difference according to PTPN2 deletions within the adult population.

Acknowledgments

The GRAALL was supported by grants P0200701 and P030425/AOM03081 from Le Programme Hospitalier de Recherche Clinique, Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, France, and the Swiss Federal Government in Switzerland. This work was supported in the Necker Hematology Department by grants from INCA PLBIO PLAN CANCER 2014-19-ASNAFI. The authors express their gratitude to "Association Laurette Fugain" and "Enfants et Santé" for financial support.

Authorship

Contribution: M.A. analyzed the data, made the figures, and wrote the paper; M.A., M.S., A.T., M.E.D., N.G., J.M.C., Y.C., C.G., H.D., N.I.,

A.P., E.M., A.B., and N.B. collected and analyzed the clinical data; L.L., A.T., M.L., N.G., J.M.C., and V.A. performed and analyzed the biological annotations; N.B. performed the statistical analyses; N.I., H.D., and A.B. were principal investigators of GRAALL and FRALLE clinical trials; and V.A. designed and supervised the study.

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

ORCID profiles: N.G., 0000-0001-6573-1312; Y.C., 0000-0001-9341-8104; H.D., 0000-0002-5454-6768; N.I., 0000-0003-3063-850X; A.P., 0000-0001-8363-1622.

Correspondence: Vahid Asnafi, Laboratoire d'hématologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France; e-mail: vahid.asnafi@aphp.fr.

References

1. Marks DI, Paietta EM, Moorman AV, et al. T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood*. 2009;114(25):5136-5145.
2. Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med*. 2015;373(16):1541-1552.
3. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002;1(1):75-87.
4. 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.
5. Soulier J, Clappier E, Cayuela J-M, et al. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood*. 2005;106(1):274-286.
6. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3398-3406.
7. Kleppe M, Lahortiga I, El Chaar T, et al. Deletion of the protein tyrosine phosphatase gene PTPN2 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2010;42(6):530-535.
8. Kleppe M, Soulier J, Asnafi V, et al. PTPN2 negatively regulates oncogenic JAK1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;117(26):7090-7098.
9. Liu Y, Easton J, Shao Y, et al. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2017;49(8):1211-1218.
10. Klingler-Hoffmann M, Fodero-Tavoletti MT, Mishima K, et al. The protein tyrosine phosphatase TCPTP suppresses the tumorigenicity of glioblastoma cells expressing a mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. 2001;276(49):46313-46318.
11. Persson C, Sävenhed C, Bourdeau A, et al. Site-selective regulation of platelet-derived growth factor beta receptor tyrosine phosphorylation by T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*. 2004;24(5):2190-2201.
12. Sangwan V, Paliouras GN, Abella JV, et al. Regulation of the Met receptor-tyrosine kinase by the protein-tyrosine phosphatase 1B and T-cell phosphatase. *J Biol Chem*. 2008;283(49):34374-34383.
13. Wiede F, Shields BJ, Chew SH, et al. T cell protein tyrosine phosphatase attenuates T cell signaling to maintain tolerance in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(12):4758-4774.
14. Shields BJ, Hauser C, Bukczynska PE, Court NW, Tiganis T. DNA replication stalling attenuates tyrosine kinase signaling to suppress S phase progression. *Cancer Cell*. 2008;14(2):166-179.
15. ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, et al. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*. 2002;22(16):5662-5668.
16. Yamamoto T, Sekine Y, Kashima K, et al. The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;297(4):811-817.
17. Lu X, Chen J, Sasmono RT, et al. T-cell protein tyrosine phosphatase, distinctively expressed in activated-B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas, is the nuclear phosphatase of STAT6. *Mol Cell Biol*. 2007;27(6):2166-2179.
18. Kleppe M, Tousseyn T, Geissinger E, et al. Mutation analysis of the tyrosine phosphatase PTPN2 in Hodgkin's lymphoma and T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2011;96(11):1723-1727.
19. Pike KA, Tremblay ML. TC-PTP and PTP1B: regulating JAK-STAT signaling, controlling lymphoid malignancies. *Cytokine*. 2016;82:52-57.

20. Petit A, Trinquand A, Chevret S, et al; French Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group (FRALLE). Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2018;131(3):289-300.
21. Bergeron J, Clappier E, Radford I, et al. Prognostic and oncogenic relevance of TLX1/HOX11 expression level in T-ALLs. *Blood*. 2007;110(7):2324-2330.
22. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975.
23. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J Clin Oncol*. 2013;31(34):4333-4342.
24. Vicente C, Schwab C, Broux M, et al. Targeted sequencing identifies associations between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(10):1301-1310.
25. Bond J, Graux C, Lhermitte L, et al. Early response-based therapy stratification improves survival in adult early thymic precursor acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Study. *J Clin Oncol*. 2017;35(23):2683-2691.
26. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
27. Durieux A-C, Prudhon B, Guicheney P, Bitoun M. Dynamin 2 and human diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(4):339-350.
28. Tremblay CS, Brown FC, Collett M, et al. Loss-of-function mutations of Dynamin 2 promote T-ALL by enhancing IL-7 signalling. *Leukemia*. 2016;30(10):1993-2001.
29. Van Vlierberghe P, Palomero T, Khiabani H, et al. PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2010;42(4):338-342.
30. Wiede F, Dudakov JA, Lu K-H, et al. PTPN2 regulates T cell lineage commitment and $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ specification. *J Exp Med*. 2017;214(9):2733-2758.
31. Tesio M, Trinquand A, Macintyre E, Asnafi V. Oncogenic PTEN functions and models in T-cell malignancies. *Oncogene*. 2016;35(30):3887-3896.
32. Tesio M, Trinquand A, Ballerini P, et al. Age-related clinical and biological features of PTEN abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2017;31(12):2594-2600.
33. Bornschein S, Demeyer S, Stirparo R, et al. Defining the molecular basis of oncogenic cooperation between TAL1 expression and Pten deletion in T-ALL using a novel pro-T-cell model system. *Leukemia*. 2018;32(4):941-951.
34. Pongers-Willems MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*. 1998;12(12):2006-2014.
35. van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, et al; European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21(4):604-611.

Annexe 2) Exploration des alterations épigénétiques dans les LAL-T

Les découvertes récentes réalisées dans le domaine de l'épigénétique ont permis d'améliorer la compréhension de nouveaux mécanismes impliqués dans l'oncogenèse T.

I. Généralités sur les processus de régulations épigénétiques :

Schématiquement, le processus de régulation épigénétique fait référence à la modulation de l'expression génique découlant des modifications de la structure chromatinienne.

Les modifications du paysage épigénétique représentent des étapes déterminantes au cours des processus d'oncogenèse. De plus, la nature potentiellement réversible de ces altérations constitue un espoir thérapeutique quant à l'utilisation de drogues ayant pour cibles les régulateurs épigénétiques fréquemment altérés dans les différents types de cancers.

La structure primaire de la chromatine appelée nucléosome est constituée d'un octamère de protéines enchâssant l'ADN ou histones. L'octamère d'histones se compose de 2 copies de chacune des sous-classes des protéines d'histones (H2A, H2B, H3 et H4). La protéine d'histone se compose d'une chaîne C-terminale et d'une queue N-terminale non repliée. Ce domaine N-terminal peut être affecté par un certain nombre de modifications post-traductionnelles ; méthylation, acétylation et ubiquitinylation qui affectent certains résidus spécifiques. Ces modifications structurelles affectant les histones, conjuguées aux phénomènes de méthylation de l'ADN sont à l'origine de la régulation hautement complexe régissant l'expression génique sans pour autant s'associer à des modifications de la séquence primaire de l'ADN (Goyama and Kitamura, 2017).

Modifications principales impliquées dans la régulation épigénétique

a) Processus de méthylation et déméthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN s'accompagne d'une modification de la chromatine en hétérochromatine et d'une répression de la transcription. Cette méthylation affecte spécifiquement les cytosines au niveau de leur carbone en position C5 pour former la 5-méthylcytosine (5mC). Il existe 3 principales DNA méthyltransférases à l'origine de la méthylation de l'ADN (DNMT1, DNMT3A et DNMT3B). La déméthylation de l'ADN est un

processus complexe faisant intervenir impliquant d'autres protéines telles que les enzymes TET et les protéines IDH1 et IDH2. Les enzymes TET catalysent l'oxydation de la 5mC en présence d α -cétoglutarate elle-même synthétisée par les protéines IDH1 et IDH2 (Figure 55).

De façon notable, la plupart des éléments participant à cette régulation ont été décrits comme susceptibles de présenter des altérations dans les LAL-T, justifiant la place centrale que représente la régulation des processus épigénétiques dans les LAL-T (Peirs et al., 2015).

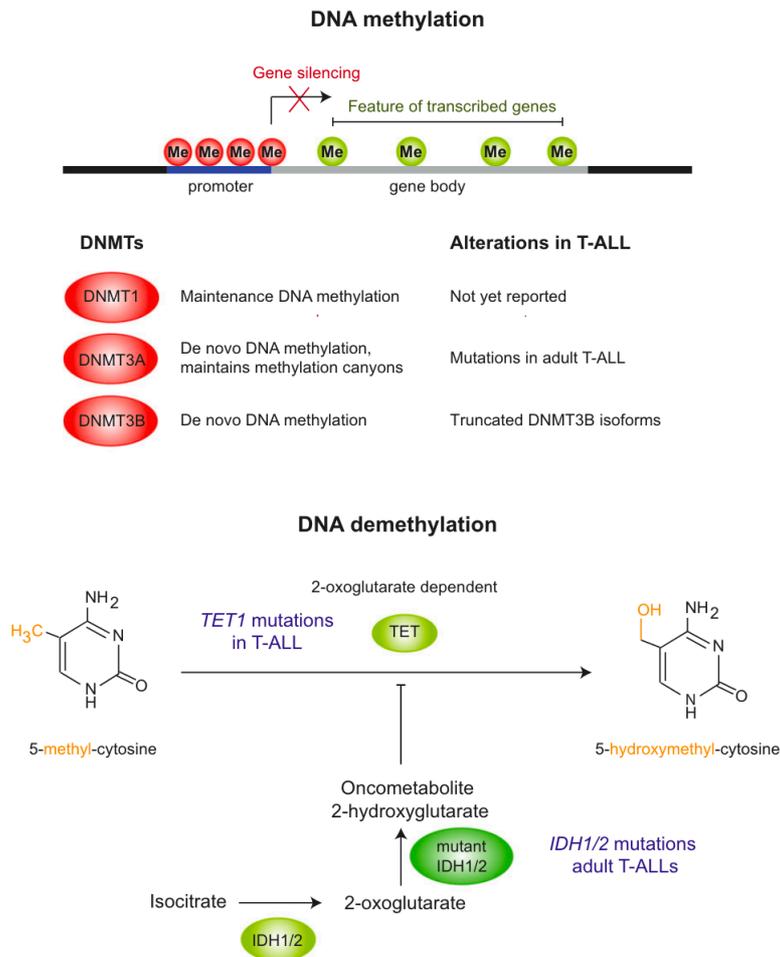


Figure 55 Représentation schématique des mécanismes de (dé) méthylation de l'ADN dans les LAL-T

Les processus de méthylation de l'ADN sont assurés par les DNA méthyltransférases (DNMTs) au niveau d'une cytosine dans un environnement de dinucléotides de CpG. La méthylation de ces îlots CpG au niveau d'un site d'initiation de la transcription (TSS) est associée à une répression de la transcription (*gene silencing*), alors que les marques de méthylation sur le gène lui-même (*gene body*) sont plutôt des marqueurs d'activation de la transcription. Parmi les DNMTs, DNMT3A est spécifiquement nécessaire au maintien de larges régions méthylées enrichies en gènes dérégulés dans les leucémies. Les mutations de *DNMT3A* sont particulièrement fréquentes dans les LAL-T de l'adulte et associées à un pronostic défavorable. Les enzymes de la famille des « *ten-eleven translocation* » (TET) catalysent la conversion d'une cytosine méthylée en 5-hydroxyméthyl-cytosine, conduisant à la déméthylation de l'ADN. Les mutations de *TET1* sont retrouvées dans 6 à 13% des LAL-T. Les mutations d'*IDH1/2* sont principalement retrouvées dans les LAL-T immatures, elles conduisent à une inhibition de l'activité des enzymes TET via la production d'un oncométabolite (2-hydroxyglutarate). (Peirs et al., 2015)

2. Les modifications épigénétiques affectant les histones

1) Acétylation

L'acétylation des histones au niveau de leurs lysines peut avoir lieu sur différentes localisations de la queue N-terminale (H3K9, H3K14 et H3K29) et conduisent à l'ouverture chromatinienne permettant le recrutement des facteurs de transcriptions. Ainsi, l'acétylation des histones est classiquement reliée à l'activation de la transcription. Le processus d'acétylation/désacétylation des histones est orchestré par les histones acétylases (KAT) et les histones dé-acétylases (HDAC). Les protéines KAT sont notamment composées des protéines CREBBP et EP300. Les marques d'acétylations sont secondairement reconnues par les BET protéines (*Bromodomain and extra-terminal*) BRD2, BRD3 et BRD4 qui vont conduire à l'activation de la transcription en reliant d'une part les régions riches en histones acétylés et la machinerie nécessaire à l'initiation de la transcription puis en favorisant la fixation de la RNA polymérase II (Figure 56) (Filippakopoulos and Knapp, 2014).

2) Méthylation

A l'inverse de l'acétylation qui est généralement associée à l'activation de la transcription, la méthylation des histones peut conduire soit à une activation soit à une répression de la transcription selon la localisation du résidu lysine affecté et le degré de méthylation associé. Ainsi, la méthylation en H3K4, H3K36 et H3K79 est associée à une activation de la transcription, alors que la diméthylation et la triméthylation en H3K9 (H3K9me2 ou H3K9me3) et en H3K27 (H3K27me2 ou H3K27me3) sont associées à une répression transcriptionnelle. La monométhylation en H3K9 (H3K9me1) et en H3K27 ((H3K27me1) sont retrouvées au niveau des sites de promoteurs actifs. La méthylation des histones est régulée par des *histones lysines transférases* (KMT) et des *lysines déméthylases* (KMD). La méthylation en H3K4, spécifiquement associée à une activation transcriptionnelle, est initiée par des méthyltransférases à domaine SET telles que KMT2A (MLL1) et KMT2B (MLL2). D'autres enzymes telles que SETD2 et WHSC1 sont responsables de la méthylation en H3K36. H3K79 est principalement méthylé par DOT1L. La méthylation en H3K27 qui est une marque connue d'inactivation, est induite le complexe PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) composé de SUZ12, EED et EZH2. ASXL1 peut également s'associer au complexe

PRC2 et participe ainsi à augmenter son activité répressive (Figure 56) (Goyama and Kitamura, 2017).

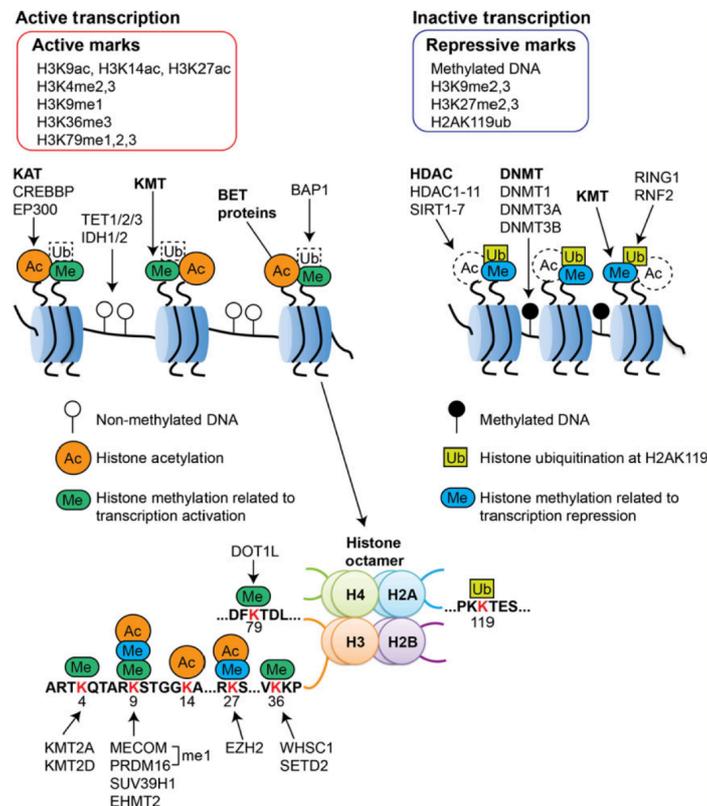


Figure 56 Modifications épigénétiques affectant les histones conduisant à une modulation de l'expression génique.

L'ADN est condensée autour des protéines d'histones elles-mêmes composées d'un octamère contenant 2 copies de chaque sous-unité d'histone ; H2A, H2B, H3 et H4. Les marques d'acétylation des histones sont généralement associées à une régulation positive de la transcription et sont ajoutées par des lysines acétyltransférases (KAT) comme EP300 ou CREBBP. À l'inverse ces marques d'acétylation sont négativement régulées par des histones désacétylases (HDAC). Les protéines BET se lient aux marques d'acétylation des histones afin d'activer la transcription. La méthylation des histones peut conduire à une répression ou une activation de l'activité de transcription en fonction du résidu concerné par ces marques de méthylation et le degré de celle-ci. Enfin, l'ubiquitinylation de la lysine en H2AK119 est associée à une répression de la transcription. (Goyama and Kitamura, 2017)

3) Focus H3K4me3

Les différentes cellules qui composent les organismes multicellulaires sont caractérisées par des profils transcriptionnels spécifiques. Il est maintenant bien démontré que les états de la chromatine influencent certains aspects de la transcription, tels que les niveaux d'expression ou l'épissage alternatif, et peuvent jouer un rôle dans l'établissement et le maintien des programmes d'expression des gènes. (Bernstein et al., 2005) Par exemple, certains enhancers contrôlent l'expression des gènes impliqués dans l'identité cellulaire.

La triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) est une modification majeure de la chromatine chez les eucaryotes (Santos-Rosa et al., 2002). La triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 (H3K4me3) représente une modification chromatiniennne connue

pour être une marque d'activation du site d'initiation de la transcription (TSS, transcription start site) (

Figure 57) (Collins et al., 2019). Les modificateurs de H3K4me3 jouent des rôles dans des processus biologiques fondamentaux, notamment le développement embryonnaire et la biologie des cellules souches (Ang et al., 2011). Les perturbations des complexes modificateurs de H3K4me3 peuvent conduire au développement de cancers chez les mammifères (Shilatifard, 2012) et à des modifications de la durée de vie chez les invertébrés (Greer et al., 2010). La marque H3K4me3 est associée aux promoteurs des gènes activement transcrits (Guenther et al., 2007) où elle joue le rôle d'un interrupteur transcriptionnel (Dong et al., 2012). Cependant, cette marque H3K4me3 peut également se retrouver sur des gènes « *en attente* » de transcription (Bernstein et al., 2005), et cette transcription peut également avoir lieu en l'absence de marque H3K4me3 (Hödl and Basler, 2012). Ainsi, la manière dont cette marque affecte les programmes transcriptionnels spécifiques afin d'influencer diverses fonctions cellulaires est encore peu claire.

Les marques chromatinienne active sont généralement restreintes à des loci génomiques spécifiques mais ont également été observées dans des dépôts plus larges (~kilobases)(Parker et al., 2013), on parle alors de *Broad domain* (domaine étendu en français). Ainsi, de larges Broad domain de H3K4me3 ont été rapportés dans les cellules souches embryonnaires (ESC), les cellules de la tumeur de Wilms et les cellules souches hématopoïétiques. (Adli et al., 2010; Aiden et al., 2010).

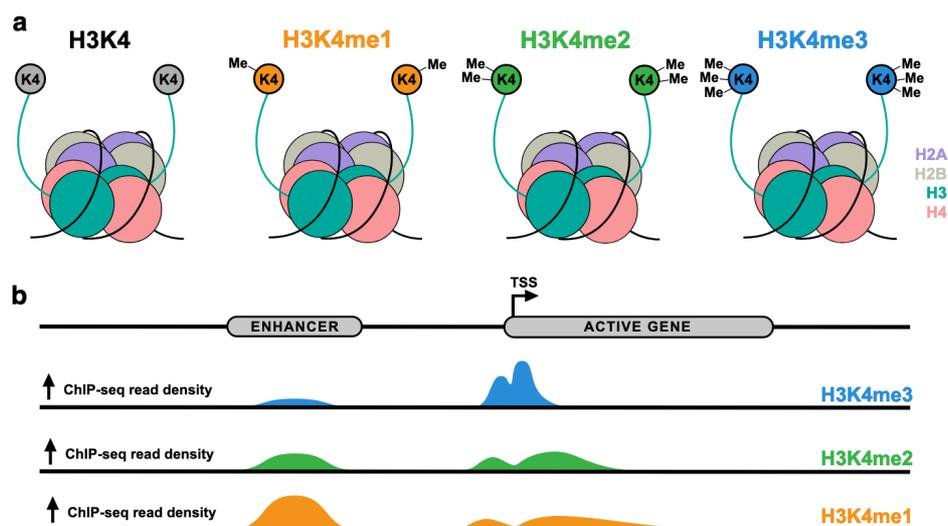


Figure 57 Les marques de méthylation en H3K4 et leurs distributions dans le génome.

(a) Chacun des résidus composant l'octamère d'histones possède une queue N-terminale contenant des résidus lysines potentiellement accessibles à des modifications post-traductionnelles. La lysine K4 de la sous unité H3 peut ainsi être mono-

(orange), bi-(vert) ou tri-(bleu) méthylée, créant ainsi respectivement les éléments H3K4me1, H3K4me2 et H3K4me3. (b) Les marques de méthylation en H3K4, H3K4me1, H3K4me2 et H3K4me3 sont situées dans des régions spécifiques du génome. Les 3 marques sont retrouvées de façon abondante à proximité des sites d'initiation de la transcription de gènes fortement exprimés. De plus, les marques H3K4me1 sont retrouvées dans les régions distales des gènes, au niveau des enhancers. (Collins et al., 2019)

Le rôle précis de ces « *Broad domain* » H3K4me3 est encore en cours d'étude. Il est cependant important de noter que la distribution des marques H3K4me3 de type « *peak* » ou « *narrow* » c'est-à-dire concernant une séquence d'ADN de longueur restreinte et centrée sur le site d'initiation de la transcription (TSS, *Transcription Start Site*) vs les marques suivant une distribution de type « *Broad domain* » où les marques de méthylation H3K4me3 concernent une zone étendue du gène ($\geq 4\text{kb}$), ne se font pas au hasard et que les gènes concernés par l'une ou l'autre marque de méthylation présentent des différences fonctionnelles significatives (*Figure 58*). Ainsi, il a été rapporté que les marques H3K4me3 de type « *peak* » concernaient essentiellement des gènes ubiquitaires alors que les marques H3K4me3 de type « *Broad domain* » se retrouvaient sur des gènes impliqués dans l'identité cellulaire propre à chaque sous-type cellulaire mais concernaient également des gènes suppresseurs de tumeurs comme *TP53* et *PTEN*. De façon, remarquable, ce sont également ce type de marques H3K4me3 qui apparaissent au niveau des oncogènes présentant une activation dérégulée dans les modèles tumoraux (Chen et al., 2015), justifiant ainsi leur étude dans les LAL-T.

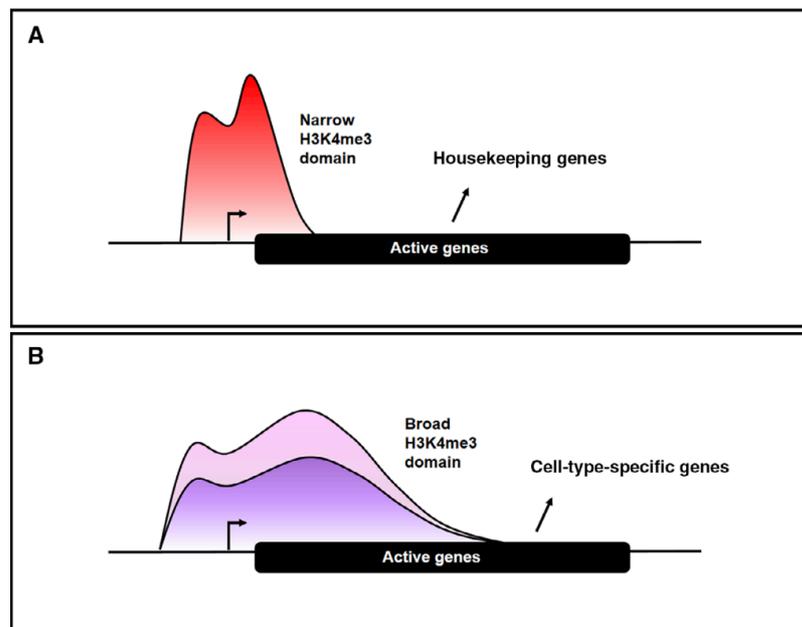


Figure 58 Distribution non aléatoire des marques H3K4me3. Distinction entre « *Peak* » et « *Broad domain* » des marques H3K4me3

Les marques H3K4me3 de type « *peak* » ou « *narrow* » se retrouvent principalement au niveau des gènes ubiquitaires. En revanche, les marques étendues de type « *Broad H3K4me3 domain* » sont retrouvées au niveau des gènes impliqués dans la différenciation des sous-types cellulaires. Elles sont aussi retrouvées au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules « normales » mais également au niveau des oncogènes dans les cellules tumorales. ((Park et al., 2020)

II. Présentation du travail : Analyse des marques de méthylation H3K4me3 dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T.

Dans ce travail publié en 2021 dans *Genome Research*, nous avons réalisé une analyse différentielle du profil de méthylation de type H3K4me3 dans les cellules thymiques comparativement aux LAL-T.

Nous avons focalisé cette étude sur l'analyse des marques de méthylation de type H3K4me3 en raison de leur rôle encore partiellement inexploré dans les processus d'oncogenèse notamment dans le cadre des LAL-T.

L'analyse comparative de la distribution spatiale des marques de méthylation entre les cellules thymiques et les LAL-T (prélèvements primaires et lignées de LAL-T) a permis de mettre en évidence l'acquisition d'un profil de méthylation spécifique aux cellules tumorales. De façon notable nous avons également montré que les marques de type H3K4me3 *étendue* (« *Broad domain* ») se retrouvaient au niveau des oncogènes spécifiquement dérégulés dans les différents sous-types oncogéniques de LAL-T et s'accompagnaient d'une dérégulation sur le plan transcriptionnelle cohérente avec le profil de méthylation.

À partir de l'étude d'un modèle pré-leucémique unique, conduisant à la surexpression rétrovirale de TLX3 dans des cellules thymiques immatures doubles négatives (DN3) murines nous avons également pu démontrer de façon dynamique les modifications des marques de méthylation qui affectent les lymphoblastes au cours des processus d'acquisitions oncogéniques. De façon particulièrement intéressante nous avons décrit un « *switch* » de distribution des marques H3K4me3, initialement ces dernières se localisent essentiellement aux niveaux des gènes impliqués dans le maintien de l'identité cellulaire puis vont progressivement se répartir aux niveaux de gènes impliqués dans le développement du cancer au cours de l'acquisition d'un phénotype de cellules pré-leucémiques. Cette approche souligne le rôle majeur des dérégulations épigénétiques dans les phases précoces du développement tumoral.

Enfin, d'un point de vue thérapeutique, nous avons également montré que les dérégulations associées aux marques de type H3K4me3 dans les LAL-T pouvaient constituer des cibles thérapeutiques. Ainsi, nous avons montré que les LAL-T présentant une proportion élevée de « *Broad domain* » H3K4me3 comme la lignée Loucy, était associée à une sensibilité majorée au PBIT, un inhibiteur de KDM5 (un des membres de la famille des H3K4me3 déméthylase). Paradoxalement, l'augmentation des marques H3K4me3 provoqué par le PBIT

s'accompagne d'une diminution de la prolifération dans les LAL-T. En effet, le PBIT augmente les marques de méthylation en H3K4me3 mais principalement au niveau de régions impliqués dans l'hématopoïèse normale et la différenciation T.

Ce travail a permis d'identifier pour la 1^o fois les dérégulations épigénétiques affectant les marques de méthylation de type H3K4me3 dans les LAL-T en mettant également en évidence le caractère dynamique d'acquisition de ces anomalies et leurs rôles majeurs dans les étapes précoces de la leucémogénèse. Enfin, il renforce l'intérêt de cibler les altérations épigénétiques dans ce type de pathologies mais pose la question de la sélection des patients pouvant bénéficier de telles drogues, tant les facteurs impliqués dans ce type de régulations sont nombreux et l'intégration du « signal » épigénétique final complexe à synthétiser.

Article VIII

Titre :

Dynamic of broad H3K4me3 domains uncover an epigenetic switch between cell identity and cancer-related genes

Co-auteurs :

Mohamed Belhocine, **Mathieu Simonin**, José David Abad Fores, Agata Cieslak, Iris Manosalva, Lydie Pradel, Charlotte Smith, Eve-Lyne Mathieu, Guillaume Charbonnier, Joost H.A. Martens, Hendrik G. Stunnenberg, Ahmad Maqbool, Aneta Mikulasova, Lisa J. Russell, Daniel Rico, Denis Puthier, Pierre Ferrier, Vahid Asnafi and Salvatore Spicuglia

État de article :

Publié

Nom de la revue :

Genome Research

Année de Publication :

2021

Dynamics of broad H3K4me3 domains uncover an epigenetic switch between cell identity and cancer-related genes

Mohamed Belhocine,^{1,2,3,4} Mathieu Simonin,³ José David Abad Flores,^{1,2} Agata Cieslak,³ Iris Manosalva,^{1,2} Lydie Pradel,^{1,2} Charlotte Smith,³ Eve-Lyne Mathieu,^{1,2} Guillaume Charbonnier,^{1,3} Joost H.A. Martens,⁵ Hendrik G. Stunnenberg,⁵ Muhammad Ahmad Maqbool,⁶ Aneta Mikulasova,⁷ Lisa J. Russell,⁸ Daniel Rico,⁷ Denis Puthier,^{1,2} Pierre Ferrier,⁹ Vahid Asnafi,³ and Salvatore Spicuglia^{1,2}

¹Aix-Marseille University, Inserm, Theories and Approaches of Genomic Complexity (TAGC), UMR1090, 13288 Marseille, France; ²Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, 13288 Marseille, France; ³Université de Paris (Descartes), Institut Necker-Enfants Malades (INEM), Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) U1151, and Laboratory of Onco-Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker Enfants-Malades, 75015 Paris, France; ⁴Molecular Biology and Genetics Laboratory, Dubai, United Arab Emirates; ⁵Department of Molecular Biology, Faculties of Science and Medicine, Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University, 6500 HB Nijmegen, Netherlands; ⁶CRUK Stem Cell Biology Group, Cancer Research UK Manchester Institute, The University of Manchester, Aderley Park, Macclesfield SK104TG, United Kingdom; ⁷Biosciences Institute, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, United Kingdom; ⁸Translational and Clinical Research Institute, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, United Kingdom; ⁹Aix Marseille University, CNRS, INSERM, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, 13288 Marseille, France

Broad domains of H3K4 methylation have been associated with consistent expression of tissue-specific, cell identity, and tumor suppressor genes. Here, we identified broad domain-associated genes in healthy human thymic T cell populations and a collection of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) primary samples and cell lines. We found that broad domains are highly dynamic throughout T cell differentiation, and their varying breadth allows the distinction between normal and neoplastic cells. Although broad domains preferentially associate with cell identity and tumor suppressor genes in normal thymocytes, they flag key oncogenes in T-ALL samples. Moreover, the expression of broad domain-associated genes, both coding and noncoding, is frequently deregulated in T-ALL. Using two distinct leukemic models, we showed that the ectopic expression of T-ALL oncogenic transcription factor preferentially impacts the expression of broad domain-associated genes in preleukemic cells. Finally, an H3K4me3 demethylase inhibitor differentially targets T-ALL cell lines depending on the extent and number of broad domains. Our results show that the regulation of broad H3K4me3 domains is associated with leukemogenesis, and suggest that the presence of these structures might be used for epigenetic prioritization of cancer-relevant genes, including long noncoding RNAs.

[Supplemental material is available for this article.]

Chromatin states play an essential role in the establishment of gene expression programs (Flavahan et al. 2017). Combinatorial patterns of histone modifications are expected to convey specific information potential that, in the end, impinges on gene expression. Important information regarding specific transcriptional outputs could be contained in the spread of epigenetic modifications over a genomic locus. Large megabase-sized chromatin domains have been described for the repressive chromatin mark H3K9me3 in senescence cells spanning large chromosomal regions (Soufi et al. 2012) or activating H3K4me3 in mammalian oocytes (Dahl et al. 2016; Liu et al. 2016; Zhang et al. 2016a). Large

epigenetic domains along the genome are also emerging as a new concept in defining tissue-specific gene regulation and in the control of normal development and cancer (Hnisz et al. 2017). Active chromatin marks usually restricted to *cis*-regulatory elements, such as enhancers and promoters, have also been observed in broader deposits (more than several kilobases). For instance, in contrast to typical enhancers that are usually <1 kb long, super-enhancers are large clusters of enhancers spanning several tens of kilobytes and are associated with large domains of H3K27ac (Hnisz et al. 2017). Super-enhancers are specifically

Corresponding authors: salvatore.spicuglia@inserm.fr, vahid.asnafi@aphp.fr

Article published online before print. Article, supplemental material, and publication date are at <https://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.266924.120>.

© 2022 Belhocine et al. This article is distributed exclusively by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the first six months after the full-issue publication date (see <https://genome.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After six months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

bound by cell type-specific master transcription factors to specifically drive the expression of cell identity genes. Moreover, they have been found at key oncogenes in many cancer types, and disruption of super-enhancers by inhibition of chromatin regulators leads to selective inhibition of key oncogenes (Zhao and Shilatifard 2019).

We and others have uncovered, reminiscent to super-enhancers, that tissue-specific and cell identity gene promoters display a unique pattern of histone modifications featuring broad enrichment of H3K4me2/me3 that extends from the transcription start site (TSS) into the gene body (Pekowska et al. 2010; Koch et al. 2011; Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015; Zacarias-Cabeza et al. 2015; Suzuki et al. 2017). H3K4 methylation is usually confined to nucleosomes surrounding transcriptionally active gene promoters (Bernstein et al. 2005; Barski et al. 2007) and some highly active enhancers (Pekowska et al. 2011). We have previously shown that tissue-specific genes expressed in T cells generally display extended H3K4 methylation within the gene body (Pekowska et al. 2010; Zacarias-Cabeza et al. 2015). Along the same line, it has been shown that H3K4me3 domains that spread more broadly over genes in a given cell type (hereafter, broad H3K4me3 domains) preferentially mark genes that are essential for the identity and function of that cell type (Benayoun et al. 2014). Besides, several complex loci have been shown to display very large H3K4me3 domains including the HOX gene clusters (Bernstein et al. 2005) and the T cell receptor loci (Zacarias-Cabeza et al. 2015). In addition, a subset of tumor suppressors is associated with broad H3K4me3 domains in nonmalignant cells and is lost in cancer cells (Chen et al. 2015). Broad H3K4me3 domains are associated with high levels of RNA Pol II recruitment and pausing (Pekowska et al. 2010; Koch et al. 2011; Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015), leading to transcriptional consistency (Benayoun et al. 2014) and limited perturbation to external factors (Chen et al. 2015). Although the presence of a broad H3K4me3 domain is associated with a relatively high level of gene expression (Benayoun et al. 2015), it rather defines a specialized chromatin structure related to tissue- and cell-specific gene regulation. Although the functional and biological relevance of broad H3K4me3 domains is clearly established, their dynamics during normal development and precise deregulation in cancer are largely unexplored. To gain insight into this issue, here we aimed to analyze the dynamics of broad H3K4me3 domains during early human T cell differentiation in comparison with those found in a collection of primary T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and cell lines.

T-ALL corresponds to a heterogeneous group of acute leukemia that is arrested at various stages of early T cell development with respect to normal thymic cell differentiation. Over the last decade, great progress has been made toward the identification of molecular and genetic abnormalities in T-ALL (Aifantis et al. 2008; Belver and Ferrando 2016; Girardi et al. 2017). A number of these genetic events, which generally involve transcription factors or epigenetic regulators, act mainly to block T cell differentiation, delineating T-ALL subgroups with specific gene expression profiles (Aifantis et al. 2008). It is therefore hypothesized that direct or indirect alterations of *cis*-regulatory elements could play a central role in the process of leukemogenesis; however, the precise mechanisms and the regulatory elements involved remain poorly characterized (Ntziachristos et al. 2016). The availability of relatively homogenous normal precursors matching the main T-ALL blockade makes it a suitable model to explore the epigenetic changes between normal and neoplastic cells. In this study, we

identify broad H3K4me3 domains in human T cell precursors and primary T-ALL samples and cell lines in order to shed light on the dynamics of broad H3K4me3 domains between normal and neoplastic cells.

Results

Identification of broad H3K4me3 domains in human thymic subpopulations

We first compared two different approaches to isolate genes associated with broad domains based on H3K4me3 ChIP-seq data (Supplemental Fig. S1). The first approach was based on density coverage of H3K4me3 on the 5' side of the gene bodies (Supplemental Fig. S1A; Pekowska et al. 2010). The second approach was based on the association of broad H3K4me3 peaks (MACS tool) with the TSS of genes (Supplemental Fig. S1B; Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015). The later studies defined broad domains from size-ranked H3K4me3 peaks based on 5% of larger peaks (Benayoun et al. 2014) or by selecting peaks >4 kb (Chen et al. 2015). To provide a more unbiased approach to set a threshold for broad H3K4me3 domains, we also tested a selection method based on the inflection point of ranked H3K4me3 peaks (Supplemental Figs. S1B, S2). Using two cut-offs based on the high and low inflection points of ranked H3K4me3 peaks allows the determination of broad H3K4me3 domains, intermediates, and sharp peaks (Supplemental Fig. S1C). Broad domains identified based on H3K4me3 coverage or size-ranked peaks were enriched in similar biological processes (Supplemental Fig. S1D). However, broad H3K4me3 domains identified with size-ranked approaches were preferentially enriched in tissue-specific gene functions. We subsequently used the inflection point-based method to identify broad H3K4me3 domains.

Previous studies have shown that broad H3K4me3 domains are associated with a specific chromatin signature linked to transcriptional elongation (Pekowska et al. 2010; Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015; Zacarias-Cabeza et al. 2015). We confirmed these findings by analyzing broad H3K4me3 domains in the Jurkat cell line (Supplemental Fig. S3). We first selected three subsets of sharp peak-associated genes with the closest expression to broad H3K4me3 domain-associated genes in Jurkat cells (Supplemental Fig. S3A). As expected, the average H3K4me3 profiles at broad domain-associated genes were larger than the sharp-associated controls and enriched in the 5' part of the gene body (Supplemental Fig. S3B). Compared with sharp-associated genes, broad domains were associated with higher levels of POLR2A, CDK7, and H3K79me2 in the gene body and, to a lesser extent, of H3K36me3. Moreover, broad H3K4me3 domain-associated genes displayed a significant reduction of POLR2A pausing (Supplemental Fig. S3C). To assess whether broad H3K4me3 domains loci can be a preferential target of transcription elongation perturbation, we analyzed published experiments in which the effect of THZ1 (an inhibitor of the cyclin kinase CDK7) and EPZ-5676 (an inhibitor of the H3K79 histone methyltransferase DOT1L) has been assayed on gene expression and H3K4me3 levels, respectively, in Jurkat cells (Kwiatkowski et al. 2014; Orlando et al. 2014). Both inhibitors had a significantly higher impact on broad domain-associated loci compared with sharp-associated genes (Supplemental Fig. S3D). Thus, consistent with previous results, we found that broad H3K4me3 domains are associated with an early transcriptional elongation signature and are shown to be more sensitive to perturbation of transcriptional elongation.

Subsequently, we identify H3K4me3 sharp peaks and broad H3K4me3 domain in human thymic subpopulations using previously generated H3K4me3 ChIP-seq data from sorted human thymocytes encompassing the main thymic T cell differentiation

stages and analyzed within the frame of the BLUEPRINT Epigenome Project (Fig. 1A; Supplemental Fig. S2; Supplemental Tables S1–S3; Stunnenberg and Hirst 2016; Cieslak et al. 2020). This included early cortical (EC; TRA⁻/TRB⁻/CD3⁻/CD4⁺/CD8⁻), late cortical (LC; TRA⁺/TRB⁺/CD3^{low}/CD4⁺/CD8⁺), single positive CD4 (SP4; TRA⁺/TRB⁺/CD3⁺/CD4⁺/CD8⁻), and single positive CD8 (SP8; TRA⁺/TRB⁺/CD3⁺/CD4⁻/CD8⁺) thymocytes. Sharp peaks and broad H3K4me3 domain displayed similar H3K4me3 signals in the different T cell subpopulations (Supplemental Fig. S2B,C). To assess whether broad H3K4me3 domain-associated genes were specifically enriched in cell identity genes, as previously suggested (Pekowska et al. 2010; Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015; Zacarias-Cabeza et al. 2015), we compared the enriched Gene Ontology (GO) biological process between the broad and sharp H3K4me3 peak-associated genes for each developmental stage (Fig. 1B). Broad H3K4me3 domains in EC thymocytes were associated with chromatin regulation and T cell differentiation, whereas the broad H3K4me3 domains in the more committed LC thymocytes were exclusively associated with T cell and immune functions. The most mature thymocytes, SP4 and SP8, were enriched in immune response and apoptosis, reflecting the positive and negative selection processes. In contrast, genes associated with sharp H3K4me3 peaks were associated with unrelated (e.g., viral process) or metabolic (tRNA processing) terms, consistent with previous results (Chen et al. 2015).

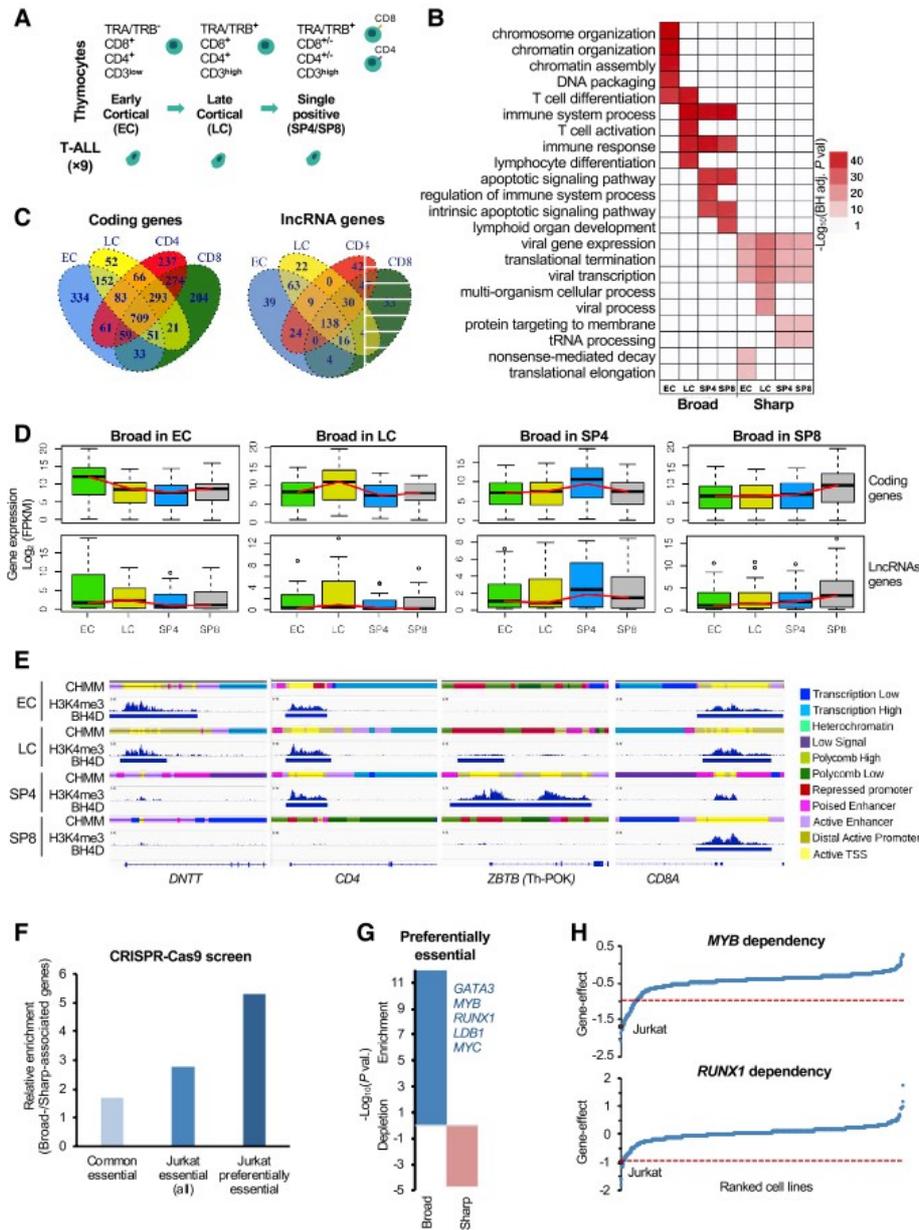


Figure 1. Dynamics of broad H3K4me3 domains during early T cell differentiation. (A) Schematic representation of the major stages of human thymopoiesis. (B) Top enriched pathways associated with broad H3K4me3 domain genes. (C) Overlap of broad H3K4me3 domains associated with coding or lncRNA genes between the thymic T cell subpopulations. (D) Box plot displaying the distribution of gene expression in each T cell subpopulation of genes associated with broad H3K4me3 domains in the indicated subpopulation. (E) Examples of dynamic broad H3K4me3 domain loci. H3K4me3 ChIP-seq signals, broad domains, and chromatin state (CHMM) profiles are shown for the indicated thymocyte subpopulations. The color-code is indicated at the right of the panel. (F) Ratio between the percentage of broad- and sharp-associated genes that were defined as commonly essential, essential in Jurkat cells, or preferentially essential in Jurkat cells based on the DepMap data set of loss-of-function CRISPR-Cas9-based screen for essential genes (for details, see Methods). (G) Significant overlap between broad- and sharp-associated genes in Jurkat cells and preferential essential genes was assessed by the hypergeometric test. (H) Example of two preferentially essential genes associated with broad H3K4me3 domains in Jurkat cells. The gene effect from the loss-of-function CRISPR-Cas9-based assays in all the cell lines is shown, and the Jurkat cell line is highlighted.

in the same thymocyte populations. In contrast, the absence of broad H3K4me3 domain at these loci is often associated with repressive chromatin enriched with Polycomb-associated states. As described before for cell lines and primary tissues, here we showed that broad H3K4me3 domains dynamically associate with cell identity genes throughout T cell differentiation, highlighting that the presence of broad H3K4me3 domains is a hallmark of key stage-specific genes.

Broad H3K4me3 domains are associated with preferentially essential genes

Previous studies have suggested that broad H3K4me3 domains in a given cell type preferentially mark genes that are essential for the identity and function of that cell type (Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015). To directly assess the functional relevance of broad H3K4me3 domain-associated genes, we analyzed the DepMap data set, a large-scale loss-of-function CRISPR-Cas9-based screen for essential genes, which was performed in 808 human cancer cell lines, including the T-ALL Jurkat cell line (Behan et al. 2019; <https://depmap.org>). We assessed the relative enrichment of broad H3K4me3 domain-associated versus sharp-associated genes in the Jurkat cell line that were found to be essential in the majority of the cell lines (common essential), essential in Jurkat (all), or preferentially essential in Jurkat (Fig. 1F; Supplemental Table S4). Preferentially essential genes were defined as the top 25% of essential genes in Jurkat cells for which the gene effect is higher in Jurkat cells compared with the average of all the other cell lines (see Methods section). We observed that broad H3K4me3 domains in Jurkat cells have the strongest relative enrichment for genes that are preferentially essential in this cell line, which functionally define cell identity genes (Fig. 1F,G). Moreover, broad H3K4me3 domains are significantly associated with preferentially essential genes in Jurkat, whereas the sharp-associated genes are significantly depleted (Chi-square test, P -value < 0.0001) (Fig. 1G). Among the broad H3K4me3 domain genes that are preferentially essential in Jurkat cells, we found several transcriptional regulators highly relevant for T-ALL leukemogenesis (Fig. 1F, inset; Supplemental Table S4A), including *MYC* and the *GATA3*, *MYB*, *RUNX1*, and *LDB1* transcription factors (Fig. 1H), which are parts of the *TAL1*-associated complex, a critical oncogenic complex active in Jurkat cells (Porcher et al. 2017). Thus, broad H3K4me3 domains mark genes that are preferentially essential in the given cell type.

Broad H3K4me3 domains flag driver oncogenes in T-ALL

Previous work has shown that broad H3K4me3 domains are associated with tumor suppressor genes in normal tissues (Chen et al. 2015), whereas the above results suggested that they can also mark oncogenic factors in cancer cells. We first analyzed the association of broad H3K4me3 domains present in normal thymocytes with a comprehensive list of 50 tumor suppressor gene in T-ALL (Supplemental Table S5), including frequently mutated genes (Liu et al. 2017). We found that broad domains present in at least one thymocyte sample were significantly associated with tumor suppressor genes (P -value = 1.3×10^{-23} , hypergeometric test) (Supplemental Fig. S4B). This is illustrated by the lymphoid-specific tumor suppressor gene *IKZF1* and the pan-cancer tumor-suppressor gene *PTEN*, which are both associated with broad domains in all thymic subpopulations (Supplemental Fig. S4C) and are previously associated with broad domains in mature CD4⁺ T cells (Chen et al. 2015). Broad domains present in thymo-

cytes and are conserved across other normal tissues (i.e., present in at least 50% of ENCODE normal tissues as defined by Chen et al. 2015) and are more frequently overlapped with tumor suppressor genes (P -value = 0.002; two-sided Fisher's exact test) (Supplemental Fig. S4B), supporting the previous finding that conserved broad domains are associated with pan-cancer tumor suppressor genes (Chen et al. 2015).

To assess the impact of broad H3K4me3 domain changes between normal T cell precursors and T-ALL neoplasia, we analyzed H3K4me3 ChIP-seq data in a series of nine primary T-ALLs and seven T-ALL-derived cell lines, using published and newly generated experiments (Supplemental Fig. S2; Supplemental Tables S1–S3). We analyzed the association of the broad H3K4me3 domain with a comprehensive list of T-ALL oncogenes and tumor suppressor genes (Supplemental Table S5), including lncRNAs, as well as, frequently mutated genes (Liu et al. 2017). Tumor suppressor genes were preferentially associated with broad H3K4me3 domains shared between T-ALL and thymocytes (Fig. 2A,B). However, we also found that T-ALL oncogenes were significantly associated with a gain of broad H3K4me3 domains in T-ALL (Fig. 2B), suggesting that the increased breadth of H3K4 trimethylation is linked to oncogenic up-regulation in cancer cells. Indeed, major driver oncogenes frequently up-regulated in T-ALL (Aifantis et al. 2008; Belver and Ferrando 2016; Girardi et al. 2017), such as *TLX1*, *TLX3*, *TAL1*, or *HOXA9*, were found to be associated with broad H3K4me3 domains in the T-ALL cell lines where they are overexpressed (Fig. 2C).

To have a more precise view of the dynamics of broad H3K4me3 domains between normal and leukemic cells, we compared their presence for a subset of genes involved in T cell differentiation or driver oncogenes frequently up-regulated in T-ALL (Aifantis et al. 2008; Belver and Ferrando 2016; Girardi et al. 2017). Although T cell genes were associated with broad H3K4me3 domains in normal and malignant cells, we found that T-ALL oncogenes were generally associated with broad H3K4me3 domains in primary and cell line T-ALLs, in agreement with their oncogenic alterations (Fig. 2D). A marked exception was the *MYC* oncogene, which harbors a broad H3K4me3 domain in normal and malignant cells, consistent with its known role in T cell differentiation and the multiple mechanisms leading to *MYC* deregulation, not necessarily involving epigenetic deregulation (Sanchez-Martin and Ferrando 2017). Several examples provided clear evidence of broad H3K4me3 domain specifically flagging oncogenes in the T-ALL samples where they are overexpressed (Fig. 2E; Supplemental Fig. S5, asterisk indicates overexpression), also including oncogenic lncRNAs such as *PVT1*, *LUNAR1*, and *NEAT1* (Supplemental Fig. S5). Thus, driver oncogenes overexpressed in T-ALL appear to acquire a broad H3K4me3 domain, likely linked to their genetic abnormalities.

Leukemic broad H3K4me3 domains switch from cell identity to cancer-related genes

We next compared the number of gains and losses of broad H3K4me3 domains between normal and T-ALL samples. We found a strong bias for a gain of broad H3K4me3 domains in T-ALL and cell lines samples (Fig. 3A; Supplemental Fig. S6), including both coding genes and intergenic lncRNAs (2.2-fold in primary T-ALL and 3.4-fold in T-ALL cells). For instance, although 4946 broad H3K4me3 domains were specific to primary T-ALL samples, only 512 were thymocyte-specific. Note, however, that a substantial percentage of specific broad H3K4me3 domains were found as

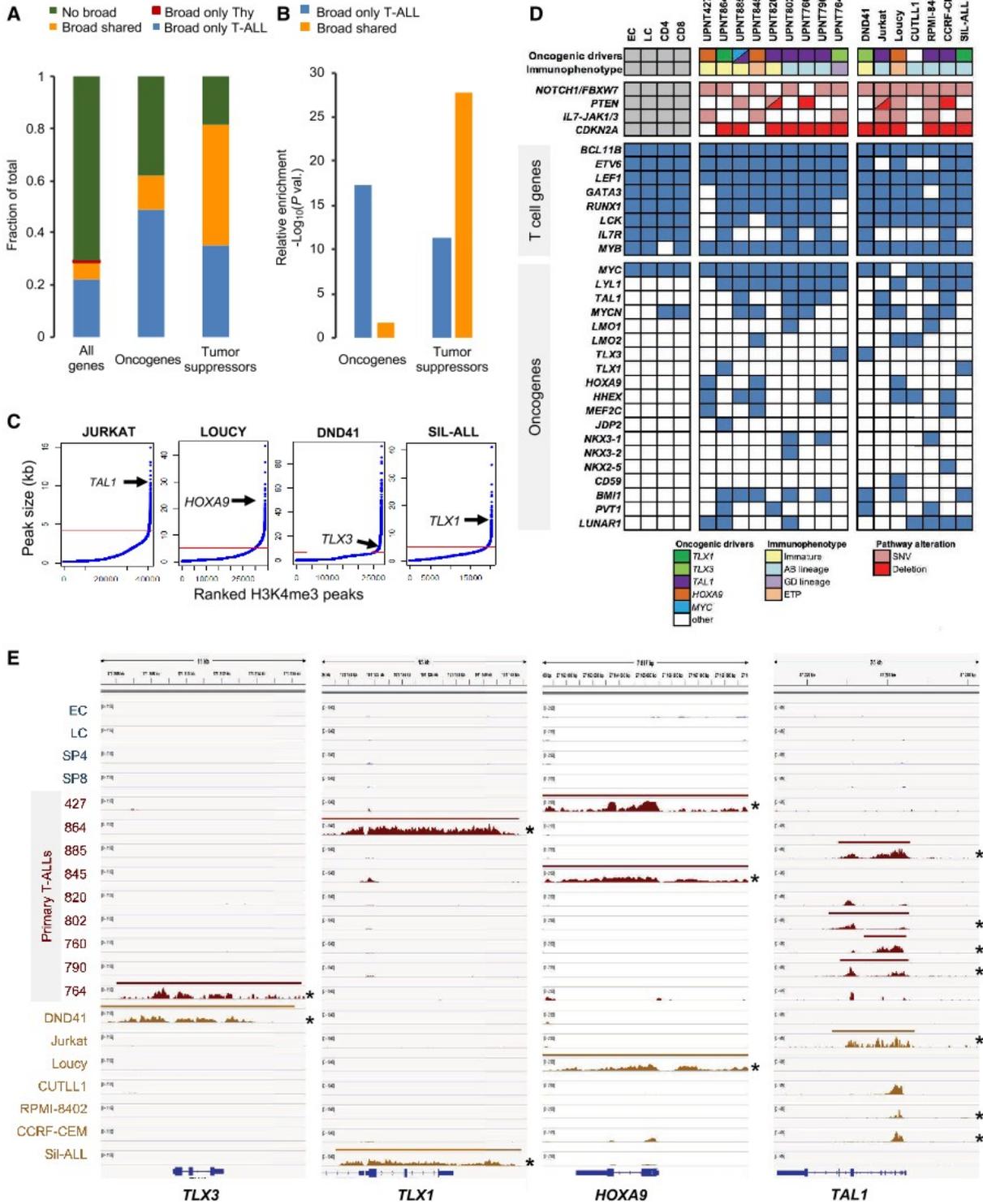


Figure 2. Characterization of broad H3K4me3 domains in T-ALL samples. (A) Distribution of the indicated category of genes associated with broad H3K4me3 domains only in thymocytes (Tc), only in T-ALL, in both thymocytes and T-ALL (shared), or without broad H3K4me3 domain (no broad). Oncogenes and tumor suppressors are listed in Supplemental Table S5. Note that no oncogene or tumor suppressor gene was associated with a broad H3K4me3 domain only in thymocytes. (B) Relative enrichment for oncogenes and tumor suppressors associated with the broad H3K4me3 domain only in T-ALL or shared between T-ALL and thymocytes was assessed by hypergeometric tests. (C) The H3K4me3 peaks were ranked according to their size for the indicated T-ALL cell lines. The inflection point allowing the selection of broad H3K4me3 domains is indicated by a red line. The position of the broad H3K4me3 domains associated with the representative oncogene is shown for each cell line. (D) Table showing the association of broad H3K4me3 domains with oncogenes frequently activated in T-ALL. The maturation states and main oncogenetic alterations of T-ALL samples are shown. (E) Examples of key oncogenes associated with broad H3K4me3 domains in T-ALL cells. H3K4me3 ChIP-seq signal and broad H3K4me3 domain tracks are shown for each thymocyte population and T-ALL sample. Asterisk indicates ectopic expression of the oncogene.

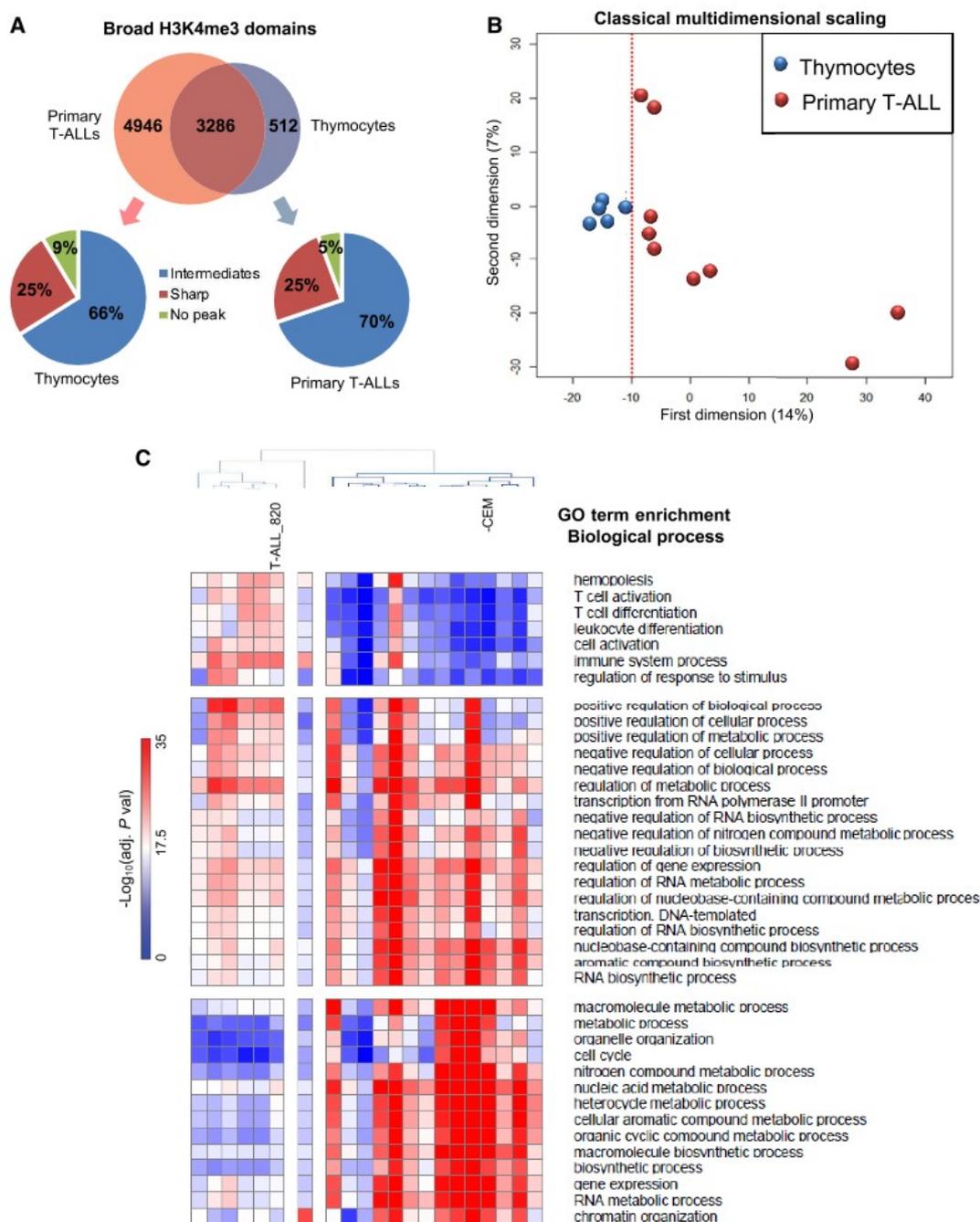


Figure 3. Comparison of broad H3K4me3 domains between normal T cell populations and T-ALL. (A) Overlap between the broad-associated genes in primary T-ALL samples and thymocytes. The distribution of T-ALL- and thymocyte-specific broad domains in thymocytes and T-ALL samples, respectively, are indicated in the *bottom* panels. (B) Multidimensional scaling classification of T cell populations and T-ALL samples according to the presence or absence of broad H3K4me3 domains. The dotted red line indicated separation between the normal and leukemic samples. (C) Clustering of normal and T-ALL samples based on the top 10 enriched biological process GO terms of each sample.

intermediate H3K4me3 peaks in the leukemic or normal counterpart, suggesting that many cancer-related changes involve a dynamic breadth of H3K4me3 peaks. Multidimensional scaling (MDS) analysis of T-ALL and thymocytes samples based solely on broad H3K4me3 domains showed that thymocyte subpopulations were grouped together, whereas the primary T-ALL samples were more sparsely distributed, suggesting a greater degree of heterogeneity among the leukemic samples (Fig. 3B). Finally, we compared the enrichment in GO terms for biological processes for the list of

thymic-specific and T-ALL-specific broad H3K4me3 domain-associated genes (Fig. 3C). We found that the enrichment scores for biological processes associated with T cell identity (e.g., T cell activation, T cell differentiation) and hematopoiesis were higher for broad H3K4me3 domains found in normal T cell precursors, whereas the enrichment scores for biological processes associated with metabolism and cell proliferation were higher for broad H3K4me3 domains found in leukemic cells. Overall, these results suggest that the dynamics of broad H3K4me3 domains in T-ALL

is associated with a switch between T cell-identity and cancer-related genes.

The expression of broad H3K4me3 domain-associated genes is preferentially deregulated in leukemia

To gain more insight into the regulation of broad H3K4me3 domain-associated genes between normal and leukemic cells, we analyzed the changes in gene expression between normal thymocytes and T-ALL samples for both coding genes and lncRNAs (Fig. 4). In the case of T-ALL cell lines, the comparison was performed with total thymus using a consistent RNA-seq data set (Fig. 4A; Atak et al. 2013). Primary T-ALLs were compared with the averaged thymocyte subpopulations using, depending on the availability, either RNA-seq (Fig. 4A) or gene-body enrichment in H3K36me3 (Fig. 4B), a histone modification directly correlated with gene expression (Barski et al. 2007). We selected broad H3K4me3 domain-associated genes in the T-ALL samples, as well as a set of genes with equal expression levels in T-ALL samples but associated with sharp H3K4me3 profiles around the TSS. We observed that

broad H3K4me3 domain-associated genes in each of the T-ALL samples were significantly up-regulated compared with the control gene set (Fig. 4A,B). On the contrary, broad H3K4me3 domain-associated genes in thymocytes were significantly down-regulated in the T-ALL samples compared with the control set (Supplemental Fig. S7). Similar analyses comparing normal B cells and primary chronic lymphocytic leukemia (CLL) lead to consistent results (Supplemental Fig. S8). Therefore, broad H3K4me3 domain-associated genes are more significantly deregulated in leukemia, independent of their relative expression level.

To explore the relevance of the deregulation of gene expression in the function of broad H3K4me3 domain dynamics, we asked whether the frequency of gain or loss of these domains could be generally associated with gene deregulation in T-ALL. To answer this question, we analyzed the fold change expression between normal thymocytes and an independent series of 41 T-ALLs (Bond et al. 2017). We grouped T-ALL broad H3K4me3 domain-associated genes according to the number of T-ALL samples with cancer-specific gain (Fig. 4C) or loss (Fig. 4D) of broad H3K4me3 domains at the associated genes (Fig. 4C,D). The recurrence of gain and loss of broad H3K4me3 domains was significantly associated with the level of, respectively, up- and down-regulation of the associated coding genes and, to a less extent, of the associated lncRNAs, thus suggesting that the recurrence of broad H3K4me3 changes is highly predictive of gene deregulation in an independent T-ALL series.

Overall, these results show that broad H3K4me3 domain-associated genes are more frequently deregulated in leukemia samples, indicating that mechanisms affecting the general expression of broad H3K4me3 domain-associated genes might be highly relevant for the oncogenic transformation. This phenomenon was true for both coding and noncoding genes, suggesting that regulation of lncRNAs associated with broad H3K4me3 domains might represent relevant candidate markers of leukemogenesis.

Overall, these results show that broad H3K4me3 domain-associated genes are more frequently deregulated in leukemia samples, indicating that mechanisms affecting the general expression of broad H3K4me3 domain-associated genes might be highly relevant for the oncogenic transformation. This phenomenon was true for both coding and noncoding genes, suggesting that regulation of lncRNAs associated with broad H3K4me3 domains might represent relevant candidate markers of leukemogenesis.

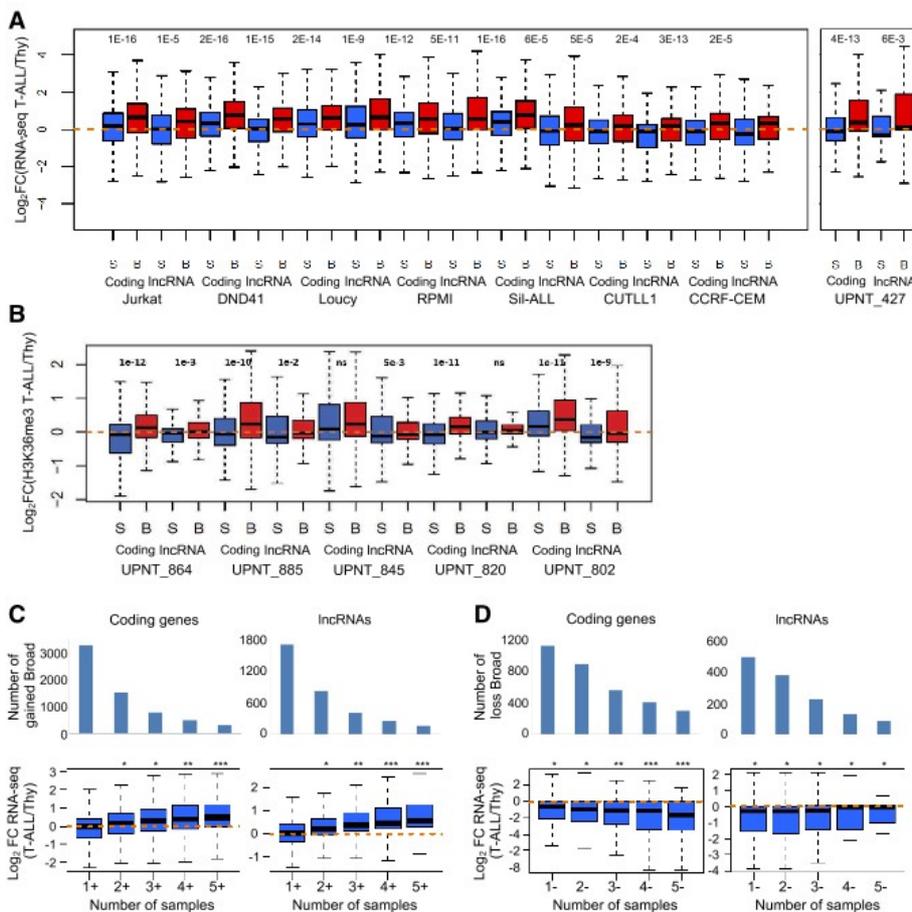


Figure 4. Dynamic expression of broad H3K4me3 domain-associated genes. (A,B) Two sets of equally expressed genes associated with broad (B) or sharp H3K4me3 peak (S) in the indicated T-ALL sample were defined based on RNA-seq data (A) or H3K4me3 gene-body enrichment (B). The fold change in expression between the T-ALL samples and the normal T cell populations was determined. (C,D) Gene expression in the function of the frequency of association with broad H3K4me3 domains in primary T-ALL samples. Genes specifically associated with broad H3K4me3 domains in T-ALL samples were separated according to the cumulative number of samples with gain (C) or loss (D). The fold change expression of coding genes and lncRNAs between the thymus and a series of independent 41 T-ALLs was analyzed. (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$, Wilcoxon rank-sum test; (ns) not significant.

Sensitivity to epigenetic perturbation in the function of broad H3K4me3 domain spread

Epigenetic drugs are attractive approaches for cancer therapy (Zhao and Shilatifard 2019). Thus, we aimed to explore whether addiction to broad H3K4me3 domains in cancer cells could provide a rationale for epigenetic targeting. We first compared the number of broad H3K4me3 domains identified in normal thymic subpopulations and T-ALL primary and cell line samples. We observed that the number of broad H3K4me3 domains was more variable among the T-ALL samples compared with normal cells (Fig. 5A; Supplemental Table S2). Indeed,

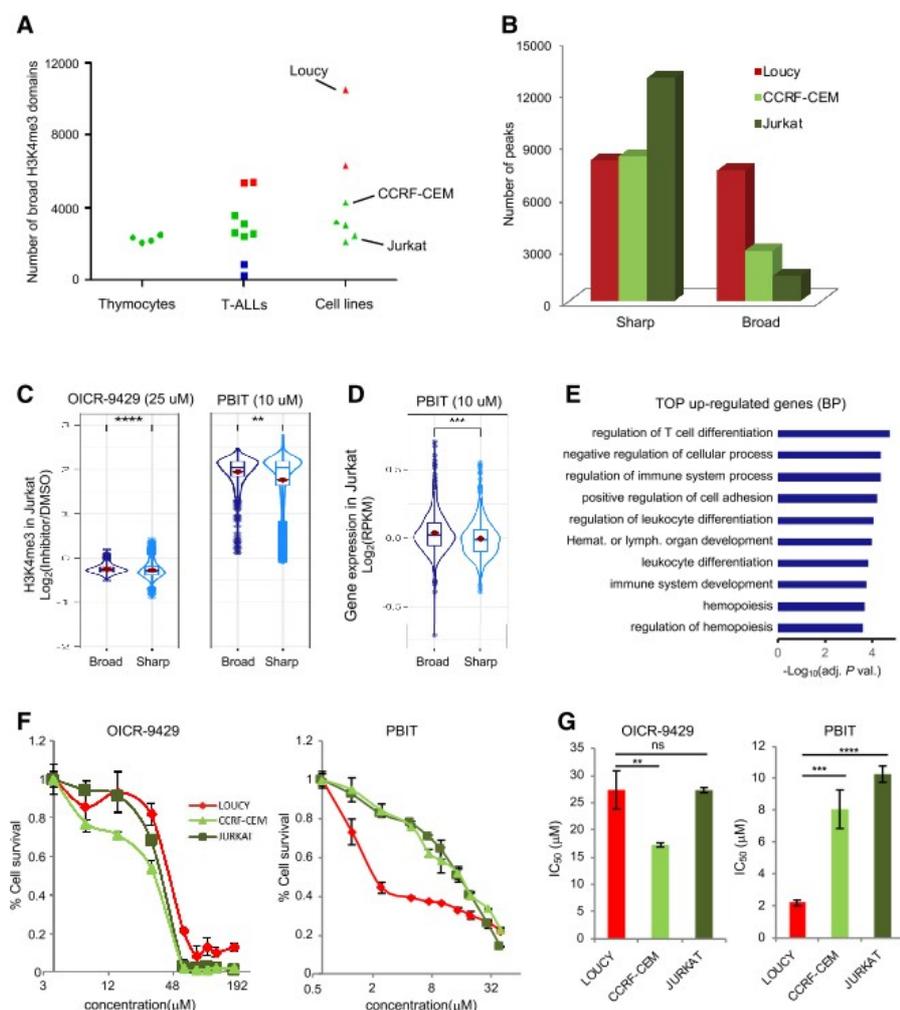


Figure 5. Extent of broad H3K4me3 domains and differential drug sensitivity. (A) Number of broad H3K4me3 domains in the thymic T cell populations, the primary T-ALL, and the T-ALL cell lines. (B) Number of sharp and broad-H3K4me3 peaks in the indicated cell lines. (C) Box plots showing the distribution of the observed fold change of H3K4me3 ChIP-seq signals at broad and sharp promoters in Jurkat cells treated with the indicated inhibitor or DMSO. (D) Box plots showing the distribution of the observed fold change of RNA-seq FPKM at broad- and sharp-associated genes in Jurkat cells treated with PBIT or DMSO. (E) Top 10 GO terms for biological process enriched at genes associated with broad H3K4me3 domains that were up-regulated after PBIT treatment of Jurkat cells. (F) Proliferation assay of Loucy, CCRF-CEM, and Jurkat T-ALL cell lines in the presence of the indicated concentrations of OICR-9429 or PBIT inhibitor for 72 h. Results are the mean of three independent experiments. (G) Bar chart shows average \pm SD IC_{50} values ($n=3$) obtained in the proliferation assays shown in F. Significance in C and D was assessed by the Wilcoxon rank-sum test. Significance in G was assessed by a two-sided Student t -test. Error bars, SD. (****) $P < 0.0001$, (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$.

some leukemic cells displayed a very low number of broad H3K4me3 domains (primary T-ALL samples 764, 885, and 427), whereas others showed higher numbers (cell lines Loucy and DND41 and primary T-ALL samples 864 and 845) of broad H3K4me3 domains, pointing out to potential global deregulation of epigenetic complexes affecting H3K4me3 spreading. Moreover, the Loucy and DND41 cell lines have broad H3K4me3 domains of a larger size compared with thymocytes and other leukemic cells (P -value $< 10^{-313}$, Wilcoxon rank-sum test) (Supplemental Fig. S9). For instance, the Loucy cell line harbors a SET-NUP214 fusion oncogene that has been shown to recruit DOT1L methyltransferase, leading to aberrant H3 methylation patterns and transcriptional activation of the *HOXA* gene cluster (Okada et al. 2005;

Van Vlierberghe et al. 2008). Consistently, an extremely large broad H3K4me3 domain at the *HOXA* gene cluster is observed in the Loucy cell line (Fig. 2E).

To assess whether broad H3K4me3 domains are more or less sensitive than sharp H3K4me3 peaks to perturbation of H3K4me3 levels, we performed H3K4me3 ChIP-seq experiments from Jurkat cells treated with DMSO or with either 2-(4-methylphenyl)-1,2-benzisothiazol-3(2H)-one (PBIT), a specific inhibitor of the KDM5 family of H3K4me3 demethylases (Blair et al. 2011; Sayegh et al. 2013), or OICR-9429, an inhibitor of the MLL-WDR5 complex, previously shown to decrease cellular levels of H3K4me3 (Grebien et al. 2015). As expected, OICR-9429 treatment decreased the overall level of H3K4me3 at broad- and sharp-associated promoters, whereas treatment with PBIT resulted in increased levels of H3K4me3 (note that ChIP-seq experiments were performed with the presence of a spike-in control to account for global changes in H3K4me3 levels; see Methods) (Fig. 5C). However, we found that broad H3K4me3 domains were more sensitive to inhibition of H3K4me3 demethylases. This finding was confirmed by the analysis of gene expression after PBIT treatment (Fig. 5D). Broad H3K4me3 domain-associated genes up-regulated by the PBIT treatment were linked to hematopoiesis and T cell differentiation (Fig. 5E), suggesting that inhibition of H3K4 demethylation can induce the expression of genes involved in normal cell differentiation. Examples of broad H3K4me3 domain-associated genes that were up-regulated by PBIT included genes important for T cell differentiation and function, such as *TCF7*, *ZAP70*, *CD1A*, *IKZF1*, and *BCL11A* (Supplemental Table S6).

Next, we explored the sensitivity to the OICR-9429 and PBIT inhibitors for three cell lines—Loucy, CCRF-CEM, and Jurkat—that displayed relatively large, intermediate, and low numbers of broad H3K4me3 domain, respectively (Fig. 5B). We reasoned that perturbing the global amount of H3K4me3 in the cells could reveal the discriminating sensitivity of the cell lines in the function of their relative number of broad H3K4me3 domains. As shown in Figure 5F, treatment with PBIT, but not with OICR-9429, inhibits proliferation of Loucy cells at lower concentrations than CCRF-CEM and Jurkat cells. Indeed, the IC_{50} of PBIT for the Loucy cell line ($IC_{50} = 2.2 \mu\text{M}$) was significantly lower than for CCRF-CEM ($IC_{50} = 8.1 \mu\text{M}$) and Jurkat ($IC_{50} = 10.3 \mu\text{M}$; P -value < 0.001 , two-side t -test) (Fig. 5G) cell lines, suggesting that Loucy cells are more sensitive to increased levels of H3K4me3 than the other cell lines. These suggest that targeting broad

H3K4me3 domain-addicted samples with H3K4 demethylating inhibitors might represent a rational anticancer strategy.

Oncogene overexpression preferentially impacts broad H3K4me3 domain-associated genes

To further explore the link between oncogenic transformation and deregulation of broad H3K4me3 domains, we developed an experimental model of T-ALL by overexpressing *TLX3*, a major transcription factor oncogene in T-ALL, in mouse developing thymocytes (Fig. 6A). Sorted CD4⁻/CD8⁻ (double negative [DN]) thymocytes from wild-type mice were infected with either *GFP*- or *TLX3*-expressing retrovirus and cocultured on OP9-DL1 stroma cells. *TLX3* overexpression blocked T cell differentiation and led to a homogenous DN population of *TLX3*-expressing cells. These cells (hereafter, DN-*TLX3* cells) proliferate indefinitely on OP9-DL1 coculture but were dependent on IL7R (see Methods) and thus resembled a preleukemic cell state. DN-*TLX3* cells were subjected to gene expression and H3K4me3 ChIP-seq analyses and compared with DN thymocytes sorted from wild-type thymus (Oravecz et al. 2015). Broad H3K4me3 domains were highly dynamic between normal and transformed cells (Fig. 6B), with their gain and loss being significantly associated with up- and down-regulation of the associated genes, respectively (Fig. 6C, left). The same trend was observed when restricting the analysis to direct *TLX3* targets, defined by *TLX3* ChIP-seq peaks from DN-*TLX3* (Fig. 6C, right).

Indeed, the percentage of broad-associated promoters that were bound by *TLX3* was significantly higher than for sharp-associated promoters (P -value < 0.00001, Chi-square test) (Fig. 3D). Moreover, the expression of genes associated with broad domains in DN-*TLX3* cells was significantly up-regulated compared with a set of expression-matched genes with sharp H3K4me3 peaks (Fig. 6E). Finally, broad H3K4me3 domains that were lost in the leukemic DN-*TLX3* cells were significantly associated with genes related to normal immunological and T cell functions, whereas gained broad H3K4me3 domains were associated with genes related to cancer and leukemogenesis (Fig. 6F). Similar results were obtained when using DN thymocytes derived from *Rag2*^{-/-} mice (*Rag2*-DN) as control samples (Supplemental Fig. S10). To extend our findings to another T-ALL model, we used a recently published data set from transgenic mice overexpressing *NUP214-ABL1* oncogenic fusion along with the *TLX1* transcription factor, two cooperative oncogenic factors in T-ALL (Supplemental Table S1; Vanden Bempt et al. 2018). Analysis of broad and sharp H3K4me3 peaks in the wild-type and *NUP214-ABL1*^{+/+}/*TLX1*⁺ thymus, along with analysis of gene expression and *TLX1* binding sites, provided consistent re-

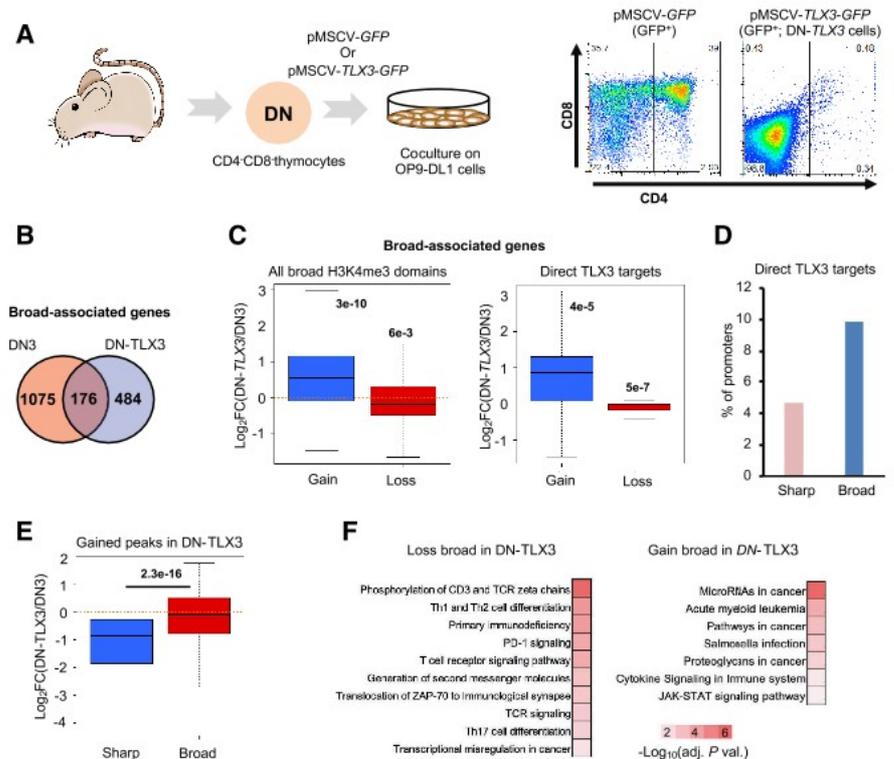


Figure 6. Dynamics of broad H3K4me3 domains in a mouse model of T-ALL. (A) Experimental workflow. Double-negative thymocytes were infected with a retroviral vector expressing *TLX3* oncogene and/or the *GFP*. After 1 mo of coculture with OP9-DL1 stromal cells, the GFP-positive cells were purified and analyzed by FACS. *TLX3* expression was confirmed by western blot using a custom-made antibody (Supplemental Figure S10A; Dadi et al. 2012). (B) Overlap between the broad H3K4me3 domains found in DN thymocytes from wild-type mice and *TLX3*⁺ leukemic cells (DN-*TLX3*). (C) Boxplot showing the fold change of expression of genes associated with broad H3K4me3 domains only in DN-*TLX3* (gain) or DN (loss; left panel). (Right) Only the direct targets of *TLX3* were analyzed. (D) Percentage of broad- and sharp-associated genes in DN-*TLX3* cells that are direct targets of *TLX3* based on *TLX3* ChIP-seq. (E) Two sets of equally expressed genes associated with broad or sharp H3K4me3 peaks in DN-*TLX3* cells were defined. The fold change of the expression between DN-*TLX3* and DN was determined. (F) KEGG pathways significantly enriched for the gene sets associated with broad H3K4me3 domains only in DN-*TLX3* (gain) or DN (loss; adjusted P -value < 0.01). The inverted log₁₀ of the Benjamin-corrected P -value is shown. (C) Significance was assessed by a Wilcoxon signed-rank test. (E) Significance was assessed by a Wilcoxon rank-sum test.

sults with those obtained with the *TLX3* model (Supplemental Fig. S11). In particular, we found that the expression of genes associated with broad H3K4me3 domains in *NUP214-ABL1*^{+/+}/*TLX1*⁺ thymus was significantly up-regulated compared with a set of expression-matched genes with sharp H3K4me3 peaks (Supplemental Fig. S11E). Thus, ectopic expression of oncogenic factors in preleukemic models of T-ALL selectively impacts on the expression of broad-associated genes, likely reproducing the situation in naturally occurring leukemias and suggesting that the epigenetic switch of broad H3K4me3 domain association from cell identity to cancer-related genes is an early process in the leukemic ontogeny.

Discussion

In this study, we took advantage of our comprehensive epigenomic resource encompassing thymic populations of human T cell precursors and primary T-ALL samples to shed light on the dynamics of broad H3K4me3 domains between normal and neoplastic cells. Previous studies have associated broad H3K4me2/3

domains with cell identity and tumor suppressor genes (Pekowska et al. 2010; Koch et al. 2011; Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015; Zacarias-Cabeza et al. 2015; Suzuki et al. 2017). Consistent with these results, in normal T cell precursors, the broad domains were found associated with key developmentally regulated genes marking T cell identity. Although tumor suppressor genes were significantly associated with broad domains in normal and leukemic cells, oncogenes were significantly associated with a gain of a broad domain in T-ALL samples. Indeed, major T-ALL oncogenes were flagged by broad domain in malignant samples where they are ectopically expressed. This indicates that the acquisition of broad domains, rather than regular sharp H3K4me3 peaks, is linked to the oncogenic events leading to ectopic expression of these oncogenes. Previous work from Chen et al. (2015) described a significant association of broad domains with tumor suppressor genes but not oncogenes. However, the apparent discrepancy with our current results is not likely owing to the different approaches used in defining broad H3K4me3 domains in the two studies (also see below) but rather the focus on normal tissues in the former study. More generally, we observed that coding and noncoding broad domain-associated genes are more frequently deregulated in leukemia compared with genes associated with sharp H3K4me3 peaks. Leukemic cells lose broad domains at T cell-related genes and gain broad domains at cancer-related genes. Using two mouse models of preleukemic cells, we show that selective deregulation of broad domain-associated genes can be an early oncogenic event driven by the ectopic expression of an oncogenic transcription factor. Overall, the dynamics of H3K4me3-broad domains between normal T cell precursors and leukemic blasts entail an epigenetic switch between cell identity and cancer-related gene regulation.

Extended H3K4 methylation and, in particular, the so-called broad H3K4me3 domains have been shown to be enriched at tissue-specific and cell identity genes in many tissues and species, from *Drosophila* to human (Pekowska et al. 2010; Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015; Dincer et al. 2015; Zacarias-Cabeza et al. 2015; Lv and Chen 2016; Park et al. 2020). Accordingly, the presence of a broad domain might be an important criteria to identify genes involved in key cellular processes (Benayoun et al. 2014; Kurum et al. 2016; Suzuki et al. 2017; Cildir et al. 2019; Collins et al. 2019; Park et al. 2020) and diseases (Dincer et al. 2015; Zhang et al. 2016b). Our study confirms and extends these observations by showing that broad domains are dynamically associated with genes playing key T cell functions and different stages of human T cell differentiation. In addition, we showed in a genome-wide manner, that for a given cell line, the presence of broad domains marks genes that are specifically essential for cell survival and proliferation in that cell line.

Extended H3K4 methylation is associated with unique epigenetic and transcriptional properties compared with sharp or TSS-centered peaks, including increased Pol II-mediated transcriptional elongation (Pekowska et al. 2010; Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015; Zacarias-Cabeza et al. 2015). Ours and previous studies have used different criteria to define broad H3K4me3 domains (Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015). For instance, whereas the signal of broad H3K4me3 defined by Chen et al. (2015) is broader but lower than sharp peaks, those defined in this paper appeared to be broader but as high as sharp peaks (Supplemental Fig. S3B). Thus, technical differences in defining broad domains might result in different broad domain subsets. Despite the use of different criteria to define broad H3K4me3 domains, we confirmed the transcriptional characteristics of broad-associated genes and fur-

ther showed that broad domains are more sensitive than H3K4me3-sharp peaks to inhibitors of transcriptional elongation. These domains appear to work as “buffer” chromatin structures, providing a better transcriptional consistency and increased transcriptional resistance to cellular perturbation (Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015). However, whether the formation of a broad domain is the consequence or the cause of transcriptional consistency will need to be explored in the future (Soares et al. 2017). Although the intrinsic genomic features allowing the establishment of broad domains still need elucidation, recent studies have provided evidence that specific chromatin complexes are required to establish and maintain these domains (Dhar et al. 2018; Quevedo et al. 2019). Our observation of large broad H3K4me3 domains in the Loucy cell line, which harbor the *SET-NUP214* fusion oncogene, provides an additional link between epigenetic deregulation in cancer cells and the establishment of the broad H3K4me3 domains.

Epigenetic dysregulation plays profound and ubiquitous roles in cancer progression and has appeared as an important contributor to hematological malignancies (Ntziachristos et al. 2016; Flavahan et al. 2017). In particular, the broad H3K4me3 domains have been shown to be associated with the regulation of tumor suppressors and oncogenes in several cancer types (Chen et al. 2015; Cao et al. 2017; Thibodeau et al. 2017; Dhar et al. 2018; Gerrard et al. 2019; Mikulasova et al. 2022) and could regulate leukemia stem cell maintenance (Wong et al. 2015). In acute lymphoblastic leukemia, promoters with high DNase I hypersensitivity and broad H3K4 methylation have a higher level of RAG-mediated cleavages and were found to be preferential targets for genomic alterations (Heinäniemi et al. 2016). Here, we found that broad domains in T-ALL flag key leukemia-associated oncogenes and entail an epigenetic switch from cell identity to cancer-related genes. Several mechanisms might contribute to the establishment and maintenance of broad domain in cancer cells (Supplemental Fig. S12). One specific mechanism leading to ectopic oncogene expression, such as in the cases of *TAL1*, *TLX1*, or *TLX3* oncogenes, is a direct consequence of genomic alterations. In these cases, the presence of the broad H3K4me3 domain is associated with the hijacking of a T cell-specific enhancer or super-enhancer (Fig. 3), leading to an epigenetic translocation. Several studies have linked the broad H3K4me3 domains with the presence of super-enhancers (Chen et al. 2015; Cao et al. 2017; Suzuki et al. 2017; Thibodeau et al. 2017; Mikulasova et al. 2022) and suggested that similar mechanisms might be involved in the establishment and maintenance of both chromatin structures (Dhar et al. 2018; Collins et al. 2019; Quevedo et al. 2019). In particular, the most gene-proximal super-enhancers colocalize with the broad H3K4me3 domains in the tumor suppressor genes and oncogenes (Cao et al. 2017; Thibodeau et al. 2017). It is therefore plausible that the proximity of the proto-oncogene with a tissue-specific (super)-enhancer impacts on the chromatin structure of the locus by establishing a broad H3K4me3 domain.

Our results also showed an overall gain of broad H3K4me3 domain at cancer-related genes, which is more compatible with an indirect role, not involving a locus-specific genetic abnormality. Supporting this idea, we observed that ectopic expression of T-ALL oncogenes directly leads to a biased gain of broad domains at cancer-related genes and up-regulation of associated genes in preleukemic cells. In addition, specific epigenetic alterations such as mutations of chromatin remodeling complexes might particularly impact the formation of the broad domains. This is illustrated by the Loucy T-ALL cell line expressing the *SET-NUP214* fusion

oncogene, which is associated with a higher number and larger size of broad domains. Independently of the mechanisms behind the establishment of the broad domains in cancer cells, these large chromatin structures might provide novel characteristics to the transcription process, including transcriptional fidelity, increased robustness of gene expression, and resistance to environmental signals, ultimately rendering the cells addicted to broad domain-associated genes. The presence of broad H3K4me3 domains could be used for epigenetic prioritization in the identification of cancer-relevant genes, including lncRNAs.

Recent successes with epigenetic therapies suggest that cancer epigenetics can have a major clinical impact (Flavahan et al. 2017). Chromatin-related proteins and modifications are considered as favorable drug targets (epidrugs), and several agents have been designed and used in different stages of clinical trials combined with currently available chemotherapies (Bradner et al. 2017; Zhao and Shilatifard 2019). In particular, super-enhancers are exceptionally vulnerable to perturbation of components commonly associated with most enhancers, such as the BET-bromodomain inhibitor JQ1 (Lovén et al. 2013; Knoechel et al. 2014) or the CDK7 inhibitor THZ1 (Kwiatkowski et al. 2014). Super-enhancers are highly sensitive to perturbation by epigenetic inhibitors (Bradner et al. 2017; Hnisz et al. 2017). This is mainly explained by the increased cooperative and synergistic binding of multiple transcription factors and coactivators at super-enhancers. Reminiscent of super-enhancers, the broad H3K4me3 domains are also large chromatin structures predicted to recruit a large number of transcription factors and chromatin remodelers and therefore are likely to be highly sensitive to epigenetic perturbations. Indeed, treatment of cancer cells with JQ1 or HAT inhibitors preferentially affects the regulation of broad H3K4me3 promoters relative to typical promoters (Suzuki et al. 2017; Gerrard et al. 2019). Here we found that inhibition of transcriptional elongation by targeting CDK7 (THZ1) or DOT1L (EPZ-5676) or inhibition of H3K4me3 demethylation with the PBIT inhibitor also has a preferential impact on broad domains. Moreover, we show that cell lines with a high number of broad domains are more sensitive to perturbation of H3K4me3 levels. Reminiscent of this finding, the LOUCY and DND41 cell lines (the two cell lines with the highest numbers of broad domains) are about 100 times more sensitive to the CDK7 inhibitor THZ1 than Jurkat cells (Kwiatkowski et al. 2014). Altogether, these results suggest that inhibition of transcriptional elongation or H3K4 demethylation might represent promising approaches to target broad H3K4me3 domain-addicted leukemic cells. As previously proposed, resistance to BRD4 inhibitors may be prevented through combined treatment with additional inhibitors targeting other chromatin-related enzymatic activities, such as H3K4 methylation (Hnisz et al. 2017). Several epidrugs have been recently proposed as attractive therapeutic targets in T-ALL (Kwiatkowski et al. 2014; Ntziachristos et al. 2014; Yashiro-Ohtani et al. 2014; Benyoucef et al. 2016). Here, we suggest that targeting broad H3K4me3 domain-addicted cells could be an additional therapeutic strategy in T-ALL and, likely, other cancer types.

Methods

Cell lines

Loucy (ACC-394), Jurkat (ACC-282), CEM-CCRF (ATCC CRM-CLL-119) RPMI-8402 (ATCC CRL-1994), and Sil-ALL (ACC-511) cell lines were cultured in RPMI-1640 medium (Thermo Fisher Scientific 21875091) supplemented with 10% FBS. Platinum-E

(Plat-E) cells were used for packaging retroviral vectors, as previously described (Morita et al. 2000). Plat-E cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FCS, 50 µg/mL streptomycin, 50 IU penicillin, 10 µg/mL blasticidin, and 1 µg/mL puromycin. OP9-DL1 stromal cell lines were maintained in α -MEM, GlutaMAX supplement medium (Thermo Fisher Scientific 32561094) supplemented with 20% FBS hyclone SH30070.03HI (Thermo Fisher Scientific 10772634) and 1% penicillin/streptomycin.

Immunophenotypic and molecular characterization of T-ALL samples

Diagnostic T-ALL samples were analyzed for immunophenotype, fusion transcripts (*SIL-TAL1*, *CALM-AF10*, *NUP214-ABL*, *MLL*), oncogenic transcripts (*TLX1* and *TLX3*), T cell receptor rearrangements, *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* mutations, and *IL7-JAK1/3* alterations, as previously described (Asnafi et al. 2003; Bergeron et al. 2007; van Dongen et al. 2012; Trinquand et al. 2013; Kim et al. 2020). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis (*CDKN2A* and *PTEN* status) was performed using the MRC Holland SALSA MLPA probe mix P383-A1 TALL according to the manufacturer's recommendations. Polymerase chain reaction products were separated by capillary electrophoresis on an ABI-3130 device. Coffalyser software (<https://www.mrcholland.com>) was used for the analysis. Quantification of *HOXA9* by qRT-PCR and definition of *HOXA9*-positive T-ALL samples were performed as previously described (Bond et al. 2016). Quantification of *TAL1* by qRT-PCR and definition of *TAL1*-positive T-ALL samples were performed as previously described (Asnafi et al. 2004). Immunophenotypic and molecular characterization of T-ALL samples is depicted in Figure 2D.

ChIP-seq experiments

ChIP-seq of H3K4me3 from human samples was performed following the BLUEPRINT protocol (Cieslak et al. 2020; <http://dcc.blueprint-epigenome.eu/#/md/methods>). ChIP-seq libraries were generated with the MicroPlex library preparation kit (Diagenode), according to the manufacturer's instructions. ChIP samples were sequenced in-house in single-end 75-nt mode using the NextSeq 500/550 (Illumina) according to the manufacturer's instructions and processed following the BLUEPRINT protocol.

Processing of ChIP-seq data

Publicly available data sets are listed in Supplemental Table S1. The reads were trimmed for low-quality reads with sickle (<https://github.com/najoshi/sickle>) and mapped to the hg19 reference genome using Bowtie 0.12.7 (Langmead et al. 2009). The peaks were called using MACS2.08 (Feng et al. 2012) with a *P*-value cut-off less than 0.1 and using the "-- broad" and "-- bdg" options. For each cell population, the respective ChIP-seq inputs were used as control data during peak calling. In addition to the peak files, MACS2 generated bedGraph files, which are transformed to bigWig files with bedGraphToBigWig. When spike-in from *Drosophila* S2 cells was available, bigWig files were produced using deepTools bamCoverage and scaling the signal by 100,000 divided by the number of reads mapping to the *Drosophila* exogenous BDGP6 genome. Peak-size distribution between two replicates of LC thymocytes was highly reproducible (Supplemental Fig. S1D). ChIP-seq of H3K4me3 and TLX3 from DN-TLX3 cells was performed as previously described (Pekowska et al. 2011; Renou et al. 2017), sequenced on an AB SOLiD v3.0 (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol, and mapped onto the NCBI37/mm9 reference genome using the SOLiD preprocessing

pipeline. TLX3 direct targets were identified with the GREAT tool using default parameters (McLean et al. 2010). Note that realigning the reads to GRCh38 (hg38) or GRCm38 (mm10) would not significantly affect the conclusions of this study as our study focus on TSS regions that inherently show low variability relative to most of the changes introduced by the hg38 or mm10 builds (Guo et al. 2017). ChIP-seq data were visualized using the Integrative Genome Viewer (IGV) (Thorvaldsdóttir et al. 2013). Metaprofiles and heatmaps were produced with deepTools v3.4.3 (Ramírez et al. 2014).

Peak annotation and identification of broad H3K4me3 domains

H3K4me3 broad, intermediate, or sharp domains were determined by identifying high (IpH) and low (IpL) inflection points of the H3K4me3 peak length (PL) versus gene rank (Supplemental Fig. S1E). The inflection point was computed using the R package “inflection” (Christopoulos 2014). The peaks are classified as broad if $PL > IpH$, as sharp if $PL < IpL$, and as intermediate if $IpL < PL < IpH$. The inflection points and the number of peaks per sample are listed in the Supplemental Table S2. Peaks were assigned to the transcripts with the overlapped TSS (between TSS and TSS + 1.5 kb). Concerning the assignment of broad H3K4me3 domains to gene transcripts, we considered that the two methods previously described (Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015) might select peaks that are not necessarily associated with the gene promoters. In the study from Chen et al. (2015), the overlapped region consisted of a window spanning from -10 kb to +4 kb from the TSS. In the study by Benayoun et al. (2014), peaks were assigned to the gene with the closest TSS, with no mention of a distance cut-off. We, therefore, choose to use a more conservative definition of gene association to retrieve broad H3K4me3 domains that overlapped the 5' region of the genes and might therefore be considered as being part of their promoters. Coding genes were based on RefSeq from hg19 assembly. Intergenic lncRNAs were defined using a comprehensive catalog of lncRNAs, including de novo lncRNAs expressed in T-ALL (Kermezli et al. 2019). The total number of histone modification peaks and the associated transcripts are provided in Supplemental Table S3. For comparison, broad H3K4me3 domains were also defined using previously published criteria (Benayoun et al. 2014; Chen et al. 2015), as described in Supplemental Figure S1B.

Average tag density profile of histone marks

The average tag density profiles around the TSS for the histone mark H3K4me3, in a given cell line, were generated by calculating the mean tag density normalized as coverage per million (CPM) within -5 kb of the TSSs of reference and control lists genes. The TSSs were grouped into different classes based on their H3K4me3 breadth at each T cell developmental stage and different cell lines. The tag density profiles were computed individually for each class, and average density over 50-bp windows was used to generate the density profiles. The average densities were computed using R script, and the profiles were plotted using the package ggplot2 under R (R Code Team 2020).

POLR2A pausing index calculation

We defined the pausing region as the region from 250 bp upstream of to 250 bp downstream from the TSS and defined the elongation region as the region from 200 bp downstream from the TSS to 200 bp upstream of the TTS. The pausing index is the pausing-to-elongation ratio of POLR2A ChIP-seq read density and was computed using R package BRGenomics getPausingIndices function (R Code Team 2020).

Functional analyses

Functional enrichment analyses of broad H3K4me3 domain-associated genes were produced using a custom pipeline to automate multisample queries to the GREAT web service (McLean et al. 2010). In summary, broad and sharp peaks were queried with the rGREAT R package (<https://github.com/jokergoo/rGREAT>) against GO biological process. Genomic association rules with genes were performed using default GREAT “basal plus extension.” Significant terms were filtered as those having binomial fold enrichment higher than two and both binomial and hypergeometric test Benjamini–Hochberg (BH)-adjusted *P*-values lower than 0.05. The GOsemSim R package (Yu 2020) was used to compute Wang similarity distance between all terms. Terms with a similarity distance higher than 0.8 were grouped. Terms were further filtered for heatmap display to keep only the best five terms for each sample according to the binomial *P*-value. The color scale on the heatmaps displays binomial BH-adjusted *P*-values. Functional comparison between thymocytes and T-ALL samples was performed using g:Profiler (Reimand et al. 2016) and the default set of all human genes as the standard background set. Overrepresented KEGG pathways for the gene sets were obtained using g:Profiler, similar to GO term enrichment analysis. The top 20 overrepresented KEGG pathways or biological GO terms with the best *P*-values were identified for each of the samples.

Preferentially essential genes

Gene effects from CRISPR-Cas9 screens for essential genes in 808 human cell lines and common essential genes were retrieved from the DepMap website (DepMap Public 20Q4 release; <https://depmap.org>). Essential genes in Jurkat cells were defined as genes for which the gene effect is lower than -1, as suggested by DepMap (Behan et al. 2019). Preferentially essential genes in Jurkat were defined as the 25% of essential genes with the lowest mean-subtracted score across all cell lines, as suggested by DepMap (Behan et al. 2019). The list of Jurkat essential and preferentially essential genes is provided in Supplemental Table S4.

Definition of cancer-related genes

Oncogenes and tumor suppressors involved in T-ALL were manually curated following authoritative reviews and original publications as indicated in Supplemental Table S5. Tumor suppressors included also frequently mutated genes (driver mutations) in T-ALL as previously published (Liu et al. 2017).

RNA-seq

The extraction of total RNA was performed using the RNeasy plus mini kit (Qiagen) according to the protocol recommended by the supplier. Total RNA was quantified using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and stored at -80°C until needed. Extracted RNA was used for the RNA-seq library preparation, using the TruSeq RNA library prep kit v2 (Illumina). Libraries were paired-end sequenced on the Illumina NextSeq 500 sequencer.

RNA-seq data analysis

Processed RNA-seq data for a series of 41 adult T-ALLs and thymic subpopulations have been previously published (Bond et al. 2017; Cieslak et al. 2020). Normalization and differential expression analyses were performed using DESeq2 (Anders and Huber 2010). Control lists were determined based on a reference gene list computed as optimally matched for similar signal level of

expression using R script. The statistical comparisons were performed using the Wilcoxon test unless mentioned otherwise.

Inhibitor treatment

PBIT (14111) was purchased from Active Motif and diluted in DMSO. Cells were seeded at the concentration of 2×10^5 /mL (in triplicate) in media containing the indicated amount of PBIT. Cell concentrations were measured after 72 h of culture using the Scepter 2 cell counter (Merck Millipore) or the disposable hemacyte C chip (393012) from Dutscher. The results were normalized with respect to the vehicle control, DMSO. OICR-9429 was purchased from Sigma-Aldrich and diluted in DMSO. The 25×10^3 Jurkat, CCRF-CEM, and Loucy cells were plated in each well of a 96-well plate per triplicate with media containing a serial dilution of OICR-9429. Plates were incubated for 72 h at 37°C. Ten microliters of cell proliferation reagent WST-1 (Sigma-Aldrich) was added to each well. Plates were then incubated for further 4 h and read using a multimode plate reader VICTOR Nivo (PerkinElmer). The values of IC₅₀ for PBIT and OICR-9429 were determined using GraphPad Prism 5.0 software. For ChIP-seq experiments, Jurkat cells were treated with either DMSO or 10 μ M PBIT or 25 μ M OICR-9429 for 5 h. The immunoprecipitation reaction was complemented with 10% of *Drosophila* chromatin from S2 cells as a spike control (Orlando et al. 2014). For RNA-seq experiments, Jurkat cells were treated with either DMSO or 10 μ M PBIT for 5 or 24 h.

Production of retroviral particles

For the production of ecotropic retroviral vector supernatants, Plat-E packaging cells (8×10^6 cells/dish) were cultured on 100-mm dishes and were transiently transfected with pMSCV-IRES-GFP or pMSCV-IRES-TLX3-GFP vectors (24 μ g/dish) using the Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen). The cells were washed 6 h later, and vector supernatants were collected 48 and 72 h after transfection and were frozen (-80°C) for further transduction of thymocytes.

Isolation and transduction of mouse DN thymocytes

Thymuses from 4- to 6-wk-old C57Bl/6 mice were extracted and mechanically disrupted on a 75- μ m nylon cell strainer (BD Biosciences Pharmingen). CD4⁺CD8⁻ DN thymocytes were purified by the depletion of CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) cells, as well as CD4⁺CD8⁻ and CD4⁻CD8⁺ single-positive (SP) cells, using the AutoMACS system (Miltenyi Biotec). Single-cell suspensions of thymocytes were stained with magnetic bead-conjugated anti-CD4 and anti-CD8 antibodies (Miltenyi Biotec 130-117-043 and 130-104-075) for 15 min at 4°C and then sorted in AutoMACS. For maximum purity, the sorting of DN cells was performed using a FACS Aria sorter (BD Biosciences). Sorted DN cells to be transduced with pMSCV-GFP or pMSCV-GFP-TLX3 retroviral vectors were resuspended in vector supernatants in the presence of 10 μ g/mL polybrene and spinoculated for 2 h at 3500 rpm. Transduced thymocytes were seeded in six-well plates in coculture with OP9-DL1 γ -irradiated cells for further T cell differentiation in vitro over 5 wk. The differentiation medium (referred to as IL7/Flt3L medium) consisted of α -MEM medium supplemented with 10% FCS, 50 μ M 2-ME, 2 mM glutamine, 10 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 10 μ g/mL gentamicin, 1% supernatant of rIL7-secreting J558L cells, and 2.5% supernatant of rFlt3L-producing SP2.0 cells. Note that DN-TLX3 cells required IL7 addition to the medium for continuous growth. All cells were maintained at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂.

Flow cytometry

Transduced thymocytes were analyzed for GFP expression and immunophenotyped by flow cytometry using the following antibodies: Pacific Blue Rat Anti-Mouse CD4 (558107), PE-Cy7 Rat Anti-Mouse CD8a (561097; both from BD Biosciences Pharmingen) at days 4, 15, 22, and 30 after transduction. All data were acquired on a BD Cantoll instrument, and seven-color analysis was performed using FlowJo software (Tree Star).

Microarray gene expression analyses

RNA from DN-TLX3⁺ cells and *Rag2*^{-/-} thymocytes (*Rag2*-DN) were analyzed in triplicate using the Affymetrix mouse gene 1.0 ST. Microarray data from DN thymocytes were obtained from Oravec et al. (2015). Expression data were MAS normalized using the Affy library from R-Bioconductor (<https://www.bioconductor.org>). Gene expression levels were determined by using the RMA-Level Gene Expression software (Affymetrix).

Data access

All raw and processed sequencing data generated in this study have been submitted to the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under the metaserie GSE164228 and are listed in Supplemental Table S1. All scripts used in this study are available at GitHub (<https://github.com/guillaumecharbonnier/mw-belhocine2021>) and as Supplemental Code S1.

Competing interest statement

The authors declare no competing interests.

Acknowledgments

We thank the Cell Imaging Platform of Institut des Maladies Génétiques Imagine, the Transcriptomics and Genomics Marseille-Luminy (TGML) sequencing platform, the Marseille-Luminy cell biology platform for the management of cell culture, and the CRISPR Screen Action platform from the Canceropôle PACA. We thank students from the master "Biologie Structurale et Génomique" (class 2020–2021, Aix-Marseille University) who provided technical help during a practical session. Work in the laboratory of S.S. was supported by recurrent funding from INSERM and Aix-Marseille University and by specific grants from the European Union's FP7 Programme (agreement no. 282510-BLUEPRINT), the Foundation for Cancer Research ARC (ARC PJA 20151203149), A*MIDEX (ANR-11-IDEX-0001-02), Plan Cancer 2015 (C15076AS), Institut National du Cancer (INCA)-PLBIO, and Ligue Contre le Cancer (Equipe Labellisée). Work in the V.A. laboratory was supported by ITMO_C15075KS "Domaine de l'épigénétique et Cancer", Association pour la Recherche contre le Cancer (Equipe labellisée 2018), and grants from INCA-PLBIO 2018-00253 and PRT-K 18-071.

Author contributions: M.B., V.A., and S.S. designed the study and wrote the manuscript. J.D.A.F., A.C., I.M., L.P., E.-L.M., J.H.A.M., H.G.S., and S.S. generated data and performed experiments. M.S., C.S., and V.A. characterized T-ALL samples. M.B., G.C., D.P., and S.S. performed bioinformatics analysis. I.M. and M.A.M. contributed to the analyses of the CRISPR-Cas9 screens data. P.F. contributed to the TLX3 model. A.M., L.J.R., and D.R. provided conceptual insights. V.A. and S.S. oversaw the conceptual development of the project. A.C., M.S., E.-L.M., C.S., and A.T.

performed research and data analysis. All authors revised and validated the manuscript.

References

- Aifantis I, Rautz E, Buonamici S. 2008. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol* **8**: 380–390. doi:10.1038/nri2304
- Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**: R106. doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106
- Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, Comba B, Le Toutour P, Estienne MH, Davi F, Landman-Parker J, Quartier P, Buzyn A, et al. 2003. Analysis of TCR, pTα, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. *Blood* **101**: 2693–2703. doi:10.1182/blood-2002-08-2438
- Asnafi V, Beldjord K, Libura M, Villaresse P, Millien C, Ballerini P, Kuhlein E, Lafage-Pochitaloff M, Delabesse E, Bernard O, et al. 2004. Age-related phenotypic and oncogenic differences in T-cell acute lymphoblastic leukemias may reflect thymic atrophy. *Blood* **104**: 4173–4180. doi:10.1182/blood-2003-11-3944
- Atak ZK, Gianfelici V, Hulselmanns G, De Keersmaecker K, Devasia AG, Geerdens E, Mentens N, Chiaretti S, Durinck K, Uytendaele A, et al. 2013. Comprehensive analysis of transcriptome variation uncovers known and novel driver events in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS Genet* **9**: e1003997. doi:10.1371/journal.pgen.1003997
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823–837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009
- Behan FM, Iorio F, Picco G, Gonçalves E, Beaver CM, Migliardi G, Santos R, Rao Y, Sassi F, Pinnelli M, et al. 2019. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. *Nature* **568**: 511–516. doi:10.1038/s41586-019-1103-9
- Belver L, Ferrando A. 2016. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **16**: 494–507. doi:10.1038/nrc.2016.63
- Benayoun BA, Pollina EA, Ucar D, Mahmoudi S, Karra K, Wong ED, Devarajan K, Daugherty AC, Kundaje AB, Mancini E, et al. 2014. H3K4me3 breadth is linked to cell identity and transcriptional consistency. *Cell* **158**: 673–688. doi:10.1016/j.cell.2014.06.027
- Benayoun BA, Pollina EA, Ucar D, Mahmoudi S, Karra K, Wong ED, Devarajan K, Daugherty AC, Kundaje AB, Mancini E, et al. 2015. H3K4me3 breadth is linked to cell identity and transcriptional consistency. *Cell* **163**: 1281–1286. doi:10.1016/j.cell.2015.10.051
- Benyoucef A, Palli CG, Wang C, Porter CJ, Chu A, Dai F, Tremblay V, Rakopoulos P, Singh K, Huang S, et al. 2016. UTX inhibition as selective epigenetic therapy against TAL1-driven T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev* **30**: 508–521. doi:10.1101/gad.276790.115
- Bergeron J, Clappier E, Radford I, Buzyn A, Millien C, Soler G, Ballerini P, Thomas X, Soulier J, Dombret H, et al. 2007. Prognostic and oncogenic relevance of *TLX1/HOX11* expression level in T-ALLs. *Blood* **110**: 2324–2330. doi:10.1182/blood-2007-04-079988
- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ III, Gingeras TR, et al. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**: 169–181. doi:10.1016/j.cell.2005.01.001
- Blair LP, Cao J, Zou MR, Sayegh J, Yan Q. 2011. Epigenetic regulation by lysine demethylase 5 (KDM5) enzymes in cancer. *Cancers (Basel)* **3**: 1383–1404. doi:10.3390/cancers3011383
- Bond J, Marchand T, Touzart A, Cieslak A, Trinquand A, Sutton L, Radford-Weiss I, Lhermitte L, Spicuglia S, Dombret H, et al. 2016. An early thymic precursor phenotype predicts outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a group for research in adult acute lymphoblastic leukemia study. *Haematologica* **101**: 732–740. doi:10.3324/haematol.2015.141218
- Bond J, Graux C, Lhermitte L, Lara D, Cluzeau T, Leguay T, Cieslak A, Trinquand A, Pastoret C, Belhocine M, et al. 2017. Early response-based therapy stratification improves survival in adult early thymic precursor acute lymphoblastic leukemia: a group for research on adult acute lymphoblastic leukemia study. *J Clin Oncol* **35**: 2683–2691. doi:10.1200/JCO.2016.71.8585; JCO2016718585
- Bradner JE, Hnisz D, Young RA. 2017. Transcriptional addiction in cancer. *Cell* **168**: 629–643. doi:10.1016/j.cell.2016.12.013
- Cao F, Fang Y, Tan HK, Goh Y, Choy JYH, Koh BTH, Hao Tan J, Bertin N, Ramadass A, Hunter E, et al. 2017. Super-enhancers and broad H3K4me3 domains form complex gene regulatory circuits involving chromatin interactions. *Sci Rep* **7**: 2186. doi:10.1038/s41598-017-02257-3
- Chen K, Chen Z, Wu D, Zhang L, Lin X, Su J, Rodriguez B, Xi Y, Xia Z, Chen X, et al. 2015. Broad H3K4me3 is associated with increased transcription elongation and enhancer activity at tumor-suppressor genes. *Nat Genet* **47**: 1149–1157. doi:10.1038/ng.3385
- Christopoulos DT. 2014. Developing methods for identifying the inflection point of a convex/concave curve. arXiv:1206.5478v2 [math.NA].
- Cieslak A, Charbonnier G, Tesio M, Mathieu EL, Belhocine M, Touzart A, Smith C, Hypolite G, Andrieu GP, Martens JHA, et al. 2020. Blueprint of human thymopoiesis reveals molecular mechanisms of stage-specific TCR enhancer activation. *J Exp Med* **217**: e20192360. doi:10.1084/jem.20192360
- Cildir G, Toubia J, Yip KH, Zhou M, Pant H, Hissaria P, Zhang J, Hong W, Robinson N, Grimbaldeston MA, et al. 2019. Genome-wide analyses of chromatin state in human mast cells reveal molecular drivers and mediators of allergic and inflammatory diseases. *Immunity* **51**: 949–965.e6. doi:10.1016/j.immuni.2019.09.021
- Collins BE, Sweatt JD, Greer CB. 2019. Broad domains of histone 3 lysine 4 trimethylation are associated with transcriptional activation in CA1 neurons of the hippocampus during memory formation. *Neurobiol Learn Mem* **161**: 149–157. doi:10.1016/j.nlm.2019.04.009
- Dadi S, Le Noir S, Payet-Bornet D, Lhermitte L, Zacarias-Cabeza J, Bergeron J, Villarsè P, Vachez E, Dik WA, Millien C, et al. 2012. TLX homeodomain oncogenes mediate T cell maturation arrest in T-ALL via interaction with ETS1 and suppression of TCRα gene expression. *Cancer Cell* **21**: 563–576. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.013
- Dahl JA, Jung I, Aanes H, Greggains GD, Manaf A, Lerdrup M, Li G, Kuan S, Li B, Lee AY, et al. 2016. Broad histone H3K4me3 domains in mouse oocytes modulate maternal-to-zygotic transition. *Nature* **537**: 548–552. doi:10.1038/nature19360
- Dhar SS, Zhao D, Lin T, Gu B, Pal K, Wu SJ, Alam H, Lv J, Yun K, Gopalakrishnan V, et al. 2018. MLL4 is required to maintain broad H3K4me3 peaks and super-enhancers at tumor suppressor genes. *Mol Cell* **70**: 825–841.e6. doi:10.1016/j.molcel.2018.04.028
- Dincer A, Gavin DP, Xu K, Zhang B, Dudley JT, Schadt EE, Akbarian S. 2015. Deciphering H3K4me3 broad domains associated with gene-regulatory networks and conserved epigenomic landscapes in the human brain. *Transl Psychiatry* **5**: e679. doi:10.1038/tp.2015.169
- Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS. 2012. Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nat Protoc* **7**: 1728–1740. doi:10.1038/nprot.2012.101
- Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. 2017. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science* **357**: eaal2380. doi:10.1126/science.aal2380
- Gerrard DL, Boyd JR, Stein GS, Jin VX, Fietze S. 2019. Disruption of broad epigenetic domains in PDAC cells by HAT inhibitors. *Epigenomes* **3**: 11. doi:10.3390/epigenomes3020011
- Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. 2017. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood* **129**: 1113–1123. doi:10.1182/blood-2016-10-706465
- Grebien F, Vedadi M, Getlik M, Giambrodo R, Grover A, Avellino R, Skucha A, Vittori S, Kuznetsova E, Smil D, et al. 2015. Pharmacological targeting of the Wdr5-MLL interaction in C/EBPα-N-terminal leukemia. *Nat Chem Biol* **11**: 571–578. doi:10.1038/nchembio.1859
- Guo Y, Dai Y, Yu H, Zhao S, Samuels DC, Shyr Y. 2017. Improvements and impacts of GRCh38 human reference on high throughput sequencing data analysis. *Genomics* **109**: 83–90. doi:10.1016/j.ygeno.2017.01.005
- Heinäniemi M, Vuorenmaa T, Teppo S, Kaikkonen MU, Bouvy-Liivrand M, Mehtonen J, Niskanen H, Zachariadis V, Laukkanen S, Liuksiala T, et al. 2016. Transcription-coupled genetic instability marks acute lymphoblastic leukemia structural variation hotspots. *eLife* **5**: e13087. doi:10.7554/eLife.13087
- Hnisz D, Shrinivas K, Young RA, Chakraborty AK, Sharp PA. 2017. A phase separation model for transcriptional control. *Cell* **169**: 13–23. doi:10.1016/j.cell.2017.02.007
- Kermezli Y, Saadi W, Belhocine M, Mathieu EL, Garibal MA, Asnafi V, Aribi M, Spicuglia S, Puthier D. 2019. A comprehensive catalog of lncRNAs expressed in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* **60**: 2002–2014. doi:10.1080/10428194.2018.1551534
- Kim R, Boissel N, Touzart A, Leguay T, Thonier F, Thomas X, Raffoux E, Huguet F, Villaresse P, Fourrage C, et al. 2020. Adult T-cell acute lymphoblastic leukemias with IL7R pathway mutations are slow-responders who do not benefit from allogeneic stem-cell transplantation. *Leukemia* **34**: 1730–1740. doi:10.1038/s41375-019-0685-4
- Knoechel B, Roderick JE, Williamson KE, Zhu J, Lohr JG, Cotton MJ, Gillespie SM, Fernandez D, Ku M, Wang H, et al. 2014. An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **46**: 364–370. doi:10.1038/ng.2913
- Koch F, Fenouil R, Gut M, Cauchy P, Albert TK, Zacarias-Cabeza J, Spicuglia S, de la Chapelle AL, Heidemann M, Hintermair C, et al. 2011. Transcription initiation platforms and GTF recruitment at tissue-specific enhancers and promoters. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 956–963. doi:10.1038/nsmb.2085

- Kurum E, Benayoun BA, Malhotra A, George J, Ucar D. 2016. Computational inference of a genomic pluripotency signature in human and mouse stem cells. *Biol Direct* **11**: 47. doi:10.1186/s13062-016-0148-z
- Kwiatkowski N, Zhang T, Rahl PB, Abraham BJ, Reddy J, Ficarro SB, Dastur A, Amzallag A, Ramaswamy S, Tesar B, et al. 2014. Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* **511**: 616–620. doi:10.1038/nature13393
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**: R25. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25
- Liu X, Wang C, Liu W, Li J, Li C, Kou X, Chen J, Zhao Y, Gao H, Wang H, et al. 2016. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature* **537**: 558–562. doi:10.1038/nature19362
- Liu Y, Easton J, Shao Y, Maciaszek J, Wang Z, Wilkinson MR, McCastlain K, Edmonson M, Pounds SB, Shi L, et al. 2017. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **49**: 1211–1218. doi:10.1038/ng.3909
- Lovén J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, Bradner JE, Lee TI, Young RA. 2013. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* **153**: 320–334. doi:10.1016/j.cell.2013.03.036
- Lv J, Chen K. 2016. Broad H3K4me3 as a novel epigenetic signature for normal development and disease. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **14**: 262–264. doi:10.1016/j.gpb.2016.09.001
- McLean CY, Bristol D, Hiller M, Clarke SL, Schaar BT, Lowe CB, Wenger AM, Bejerano G. 2010. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol* **28**: 495–501. doi:10.1038/nbt.1630
- Mikulasova A, Kent D, Trevisan-Herraz M, Karataraki N, Fung KTM, Ashby C, Cieslak A, Yaccoby S, van Rhee F, Zangari M, et al. 2022. Epigenomic translocation of H3K4me3 broad domains over oncogenes following hijacking of super-enhancers. *Genome Res* (this issue) doi:10.1101/gr.276042.121
- Morita S, Kojima T, Kitamura T. 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**: 1063–1066. doi:10.1038/sj.gt.3301206
- Ntziachristos P, Tsigos A, Welstead GG, Trimarchi T, Bakogianni S, Xu L, Loizou E, Holmfeldt L, Strikoudis A, King B, et al. 2014. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **514**: 513–517. doi:10.1038/nature13605
- Ntziachristos P, Abdel-Wahab O, Aifantis I. 2016. Emerging concepts of epigenetic dysregulation in hematological malignancies. *Nat Immunol* **17**: 1016–1024. doi:10.1038/ni.3517
- Okada Y, Feng Q, Lin Y, Jiang Q, Li Y, Coffield VM, Su L, Xu G, Zhang Y. 2005. hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell* **121**: 167–178. doi:10.1016/j.cell.2005.02.020
- Oravec A, Apostolov A, Polak K, Jost B, Le Gras S, Chan S, Kastner P. 2015. Ikaros mediates gene silencing in T cells through Polycomb repressive complex 2. *Nat Commun* **6**: 8823. doi:10.1038/ncomms9823
- Orlando DA, Chen MW, Brown VE, Solanki S, Choi YJ, Olson ER, Fritz CC, Bradner JE, Guenther MG. 2014. Quantitative ChIP-seq normalization reveals global modulation of the epigenome. *Cell Rep* **9**: 1163–1170. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.018
- Park S, Kim GW, Kwon SH, Lee JS. 2020. Broad domains of histone H3 lysine 4 trimethylation in transcriptional regulation and disease. *FEBS J* **287**: 2891–2902. doi:10.1111/febs.15219
- Pekowska A, Benoukraf T, Ferrier P, Spicuglia S. 2010. A unique H3K4me2 profile marks tissue-specific gene regulation. *Genome Res* **20**: 1493–1502. doi:10.1101/gr.109389.110
- Pekowska A, Benoukraf T, Zacarias-Cabeza J, Belhocine M, Koch F, Holota H, Imbert J, Andrau JC, Ferrier P, Spicuglia S. 2011. H3K4 tri-methylation provides an epigenetic signature of active enhancers. *EMBO J* **30**: 4198–4210. doi:10.1038/emboj.2011.295
- Porcher C, Chagraoui H, Kristiansen MS. 2017. SCL/TAL1: a multifaceted regulator from blood development to disease. *Blood* **129**: 2051–2060. doi:10.1182/blood-2016-12-754051
- Quevedo M, Meert L, Dekker MR, Dekkers DHW, Brandsma JH, van den Berg DLC, Ozgür Z, van IWFJ, Demmers J, Fornerod M, et al. 2019. Mediator complex interaction partners organize the transcriptional network that defines neural stem cells. *Nat Commun* **10**: 2669. doi:10.1038/s41467-019-10502-8
- Ramírez F, Dündar F, Diehl S, Grünig BA, Manke T. 2014. deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* **42**: W187–W191. doi:10.1093/nar/gku365
- R Core Team. 2020. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org/>.
- Reimand J, Arak T, Adler P, Kolberg L, Reisberg S, Peterson H, Vilo J. 2016. g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res* **44**: W83–W89. doi:10.1093/nar/gkw199
- Renou L, Boelle PY, Deswarte C, Spicuglia S, Benyoucef A, Calvo J, Uzan B, Belhocine M, Cieslak A, Landman-Parker J, et al. 2017. Homeobox protein TLX3 activates miR-125b expression to promote T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv* **1**: 733–747. doi:10.1182/bloodadvances.2017005538
- Sanchez-Martin M, Ferrando A. 2017. The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **129**: 1124–1133. doi:10.1182/blood-2016-09-692582
- Sayegh J, Cao J, Zou MR, Morales A, Blair LP, Norcia M, Hoyer D, Tackett AJ, Merkel JS, Yan Q. 2013. Identification of small molecule inhibitors of Jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) histone demethylase by a sensitive high throughput screen. *J Biol Chem* **288**: 9408–9417. doi:10.1074/jbc.M112.419861
- Soares LM, He PC, Chun Y, Suh H, Kim T, Buratowski S. 2017. Determinants of histone H3K4 methylation patterns. *Mol Cell* **68**: 773–785.e6. doi:10.1016/j.molcel.2017.10.013
- Soufi A, Donahue G, Zaret KS. 2012. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* **151**: 994–1004. doi:10.1016/j.cell.2012.09.045
- Stunnenberg HG, International Human Epigenome Consortium, Hirst M. 2016. The International Human Epigenome Consortium: a blueprint for scientific collaboration and discovery. *Cell* **167**: 1145–1149. doi:10.1016/j.cell.2016.11.007
- Suzuki HI, Young RA, Sharp PA. 2017. Super-enhancer-mediated RNA processing revealed by integrative microRNA network analysis. *Cell* **168**: 1000–1014.e15. doi:10.1016/j.cell.2017.02.015
- Thibodeau A, Márquez EJ, Shin DG, Vera-Licona P, Ucar D. 2017. Chromatin interaction networks revealed unique connectivity patterns of broad H3K4me3 domains and super enhancers in 3D chromatin. *Sci Rep* **7**: 14466. doi:10.1038/s41598-017-14389-7
- Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* **14**: 178–192. doi:10.1093/bib/bbs017
- Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, Lambert J, Beldjord K, Lengliné E, De Gunzburg N, Payet-Bornet D, Lhéritte L, Mossafa H, et al. 2013. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a group for research in adult acute lymphoblastic leukemia study. *J Clin Oncol* **31**: 4333–4342. doi:10.1200/JCO.2012.48.5292
- Vanden Bempt M, Demeyer S, Broux M, De Bie J, Bornschein S, Mentens N, Vandepoel R, Geerdens E, Radaelli E, Bornhauser BC, et al. 2018. Cooperative enhancer activation by TLX1 and STAT5 drives development of NUP214-ABL1/TLX1-positive T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **34**: 271–285.e7. doi:10.1016/j.ccell.2018.07.007
- van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécresse Q, Lucio P, et al. 2012. EuroFlow antibody panels for standardized *n*-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* **26**: 1908–1975. doi:10.1038/leu.2012.120
- Van Vlierbergh P, van Grotel M, Tchinda J, Lee C, Beverloo HB, van der Spek PJ, Stubbs A, Cools J, Nagata K, Fornerod M, et al. 2008. The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **111**: 4668–4680. doi:10.1182/blood-2007-09-111872
- Wong SH, Goode DL, Iwasaki M, Wei MC, Kuo HP, Zhu L, Schneidawind D, Duque-Afonso J, Weng Z, Cleary ML. 2015. The H3K4-methyl epigenome regulates leukemia stem cell oncogenic potential. *Cancer Cell* **28**: 198–209. doi:10.1016/j.ccell.2015.06.003
- Yashiro-Ohtani Y, Wang H, Zang C, Arnett KL, Bailis W, Ho Y, Knoechel B, Lanauze C, Louis L, Forsyth KS, et al. 2014. Long-range enhancer activity determines Myc sensitivity to notch inhibitors in T cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci* **111**: E4946–E4953. doi:10.1073/pnas.1407079111
- Yu G. 2020. Gene ontology semantic similarity analysis using GOSemSim. *Methods Mol Biol* **2117**: 207–215. doi:10.1007/978-1-0716-0301-7_11
- Zacarias-Cabeza J, Belhocine M, Vanhille L, Cauchy P, Koch F, Pekowska A, Fenouil R, Bergon A, Gut M, Gut I, et al. 2015. Transcription-dependent generation of a specialized chromatin structure at the TCRβ locus. *J Immunol* **194**: 3432–3443. doi:10.4049/jimmunol.1400789
- Zhang B, Zheng H, Huang B, Li W, Xiang Y, Peng X, Ming J, Wu X, Zhang Y, Xu Q, et al. 2016a. Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development. *Nature* **537**: 553–557. doi:10.1038/nature19361
- Zhang Z, Shi L, Dawany N, Kelsen J, Petri MA, Sullivan KE. 2016b. H3k4 trimethylation breadth at transcription start sites impacts the transcriptome of systemic lupus erythematosus. *Clin Epigenetics* **8**: 14. doi:10.1186/s13148-016-0179-4
- Zhao Z, Shilatifard A. 2019. Epigenetic modifications of histones in cancer. *Genome Biol* **20**: 245. doi:10.1186/s13059-019-1870-5

Received June 15, 2020; accepted in revised form May 5, 2021.

Annexe 3) Analyse comparative du paysage mutationnel des LAL-T vs LBL-T

I. Lymphomes lymphoblastiques T et leucémies aiguës lymphoblastiques T : deux noms pour une seule maladie ?

Les lymphomes lymphoblastiques T (LBL-T) et les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont les deux hémopathies issues de la transformation oncogénique d'un progéniteur T immature. Ces 2 entités partagent de nombreuses similarités, tant sur le plan clinique que biologique, ce qui explique qu'on les retrouve sous une dénomination commune dans les classifications OMS des hémopathies sous le terme "*T-lymphoblastic leukemia/lymphoma*" (Alaggio et al., 2022). C'est le taux d'infiltration médullaire ($\pm 25\%$) qui permet de faire la distinction entre LBL-T et LAL-T. La question centrale, toujours débattue, étant finalement de déterminer si ces 2 pathologies sont en fait une seule et même maladie à un stade de révélation différent (Kroeze et al., 2020).

D'un point de vue épidémiologique les LAL-T représentent environ 15% des LAL de l'enfant alors que les LBL-T comptent pour 20% des lymphomes non-Hodgkiniens de l'enfant. D'un point de vue thérapeutique et pronostique, le traitement de ces 2 entités repose sur des protocoles de chimiothérapies proches et leurs pronostics sont également superposables. (Teachey et al., 2022). De façon remarquable, alors que leurs pronostics sont proches, leurs modalités de rechutes diffèrent. Ainsi, à la rechute, 40% des LBL-T présentent une atteinte médullaire, alors qu'au diagnostic seuls 20% des LBL-T présentaient des signes d'infiltration médullaire. A l'inverse, seules 20% des LAL-T en rechute sont associées à une atteinte extramédullaire unique pouvant alors être considérée comme une composante lymphomateuse d'apparition secondaire ou existante dès le diagnostic mais présentant une résistance accrue à la chimiothérapie (Hagedorn et al., 2007). En adéquation avec ce constat, près de 11% de ces rechutes isolées de LAL-T ne présentent pas d'infiltration médullaire détectable en IgH/TCR (Hagedorn et al., 2007). Cependant ces données ne permettent pas de conclure sur la direction de la phylogénie oncogénique entre LAL-T et LBL-T, plusieurs hypothèses sont avancées pour tenter d'expliquer l'oncogenèse T et la marche « oncogénique » conduisant au développement des 2 hémopathies ; une théorie qui aurait pour point de départ une cellule lymphomateuse qui subirait une transformation leucémique ultérieure, ou au contraire l'existence d'un progéniteur commun conduisant au développement d'une LAL-T et/ou d'un LBL-T conditionnés par

l'apparition d'altérations successives participant à l'engagement dans l'un des 2 sous-type tumoral (Figure 59).

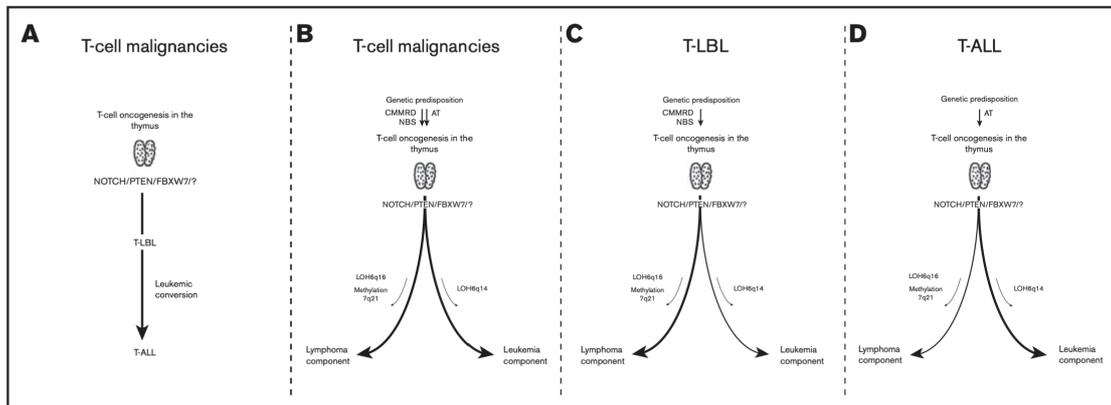


Figure 59 Hypothèses sur l'origine et le développement des LBL-T et des LAL-T.

La première alternative propose que les LAL-T émergent d'un clone de LBL-T préexistant, les 3 autres (B-D) proposent que les deux hémopathies partagent un progéniteur oncogénique commun mais l'acquisition de mutations spécifiques additionnelles orienterait l'hémopathie spécifiquement vers l'un (ou les deux) types de pathologies. (Kroeze et al., 2020)

D'un point de vue clinique ces 2 formes d'hémopathies T immatures se présentent habituellement par une volumineuse masse médiastinale associée à un envahissement des organes lymphoïdes secondaires. Sur le plan phénotypique, les LBL-T sont plus volontiers des formes matures ou corticales (Figure 60) avec notamment une expression plus faible des marqueurs myéloïdes.

	T-ALL	T-LBL
	No. of patients (%)	No. of patients (%)
Pro/pre-T-cell (pro-T: cyCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD2 ⁻ ; pre-T: CD2 ⁺)	46 (26)	23 (16)
Intermediate T-cell (CD1a ⁺)	104 (58)	105 (71)
Mature T-cell (sCD3 ⁺ , CD1a ⁻ , CD4 or CD8)	28 (16)	20 (14)
T-cell, not further classified (CD3 ⁺ , TdT ⁺)	8	69

Figure 60 Immunophénotype des LAL-T vs LBL-T

Identification phénotypique entre LAL-T et LBL-T. On remarque que les LBL-T ont un profil enrichi en phénotype corticaux et matures par rapport aux LAL-T. (Burkhardt, 2010)

Si l'oncogénétique des LAL-T commence à être largement connue, celle des LBL-T en revanche demeure peu décrite notamment en raison des difficultés d'accessibilité au matériel tumoral et de la faible infiltration tumorale associée (Wang and He, 2016).

Ainsi, d'un point de vue moléculaire les LAL-T et les LBL-T semblent présenter quelques différences notables. Par exemple les délétions du bras long du chromosome 6 ou del6q (également appelés perte d'hétérozygotie 6q ou LOH6q) concernent environ 13% des LAL-T et 19% des LBL-T. Au-delà de cette différence d'incidence, les modalités même de cette altération diffèrent entre les LBL-T et les LAL-T. Ainsi, dans les LBL-T la del6q affecte la région 6q16 vs del6q14-15 dans les LAL-T. Dans la portion spécifiquement délétée dans les LBL-T se trouve des gènes dont le rôle dans la pathogénie des LBL-T demeure inconnu (*GRIK2*, *CASP8AP2* et *EPHA7*) mais dont l'impact pronostique a été précédemment rapporté (Burkhardt et al., 2008). Concernant les altérations les plus fréquemment observées dans les LAL-T (*NOTCH1*, *FBXW7*, *RAS*, *PTEN*) celles-ci semblent être retrouvées à des fréquences comparables dans les LBL-T (Figure 61) mais ces études souffrent d'une grande hétérogénéité dans le recrutement des patients et les techniques de détection des variants. A noter que l'impact pronostique associé aux mutations de *NOTCH1*, *FBXW7* (\pm *RAS* et *PTEN*) est également retrouvé dans les LBL-T adultes et pédiatriques (Lepretre et al., 2016; Trinquand et al., 2021).

Table 1. Subtypes, mutations, and prognostic effects in T-LBL and T-ALL

Subtype	T-ALL		T-LBL	
	Aberrations/rearrangements	Outcome	Aberrations/rearrangements	Outcome
Immature	<i>MEF2C</i> , <i>HOXA</i> -activating fusions	Poor for HOXA ⁺ -ETP-ALL	<i>HOXA</i> -activating fusions, <i>TAL1</i> , <i>LMO2</i> , <i>MYC</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>TCL1A</i>	Unknown
TLX	<i>TLX3</i> , <i>HOXA</i> -activating fusions	Unknown		
Proliferative	<i>TLX1</i> , <i>NKX2-1</i> , <i>NKX2-2</i>	Favorable		
TALLMO	<i>TAL1</i> , <i>TAL2</i> , <i>LYL1</i> , <i>LMO1</i> , <i>LMO2</i> , <i>LMO3</i> , <i>MYC</i>	Unknown		
Aberration	Incidence	Prognostic effect	Incidence	Prognostic effect
<i>NOTCH1</i> ^{mut}	>50% ⁴⁰	Strong trend toward favorable	55% ⁴³	Favorable
<i>FBXW7</i> ^{mut}	11%-31% ⁴⁰	No effect	13% ⁴³	No effect
<i>NOTCH1</i> ^{mut} <i>FBXW7</i> ^{mut}	Unknown	Trend toward favorable ⁴¹	15% ⁴³	Favorable
LOH6q ^{pos}	13% ⁴⁹	No effect	19% ⁴⁸	Unfavorable
<i>PTEN</i> ^{del/mut}	13% ^{67,72}	Unfavorable	15% ^{69,72}	Unfavorable
<i>PTEN</i> ^{del/mut} <i>NOTCH1</i> ^{mut}	—	Favorable ⁷⁸	—	Favorable ⁶⁹
<i>PTEN</i> ^{del/mut} LOH6q ^{pos}	—	Unknown	—	Unfavorable ⁶⁹
PHF6 ^{mut}		No effect ⁵⁷		Favorable
Pediatric	16% ⁵⁵		—	
Adult	39% ⁵⁵		25% ³⁴	
IL7R ^{mut}				
Pediatric	35% ⁶⁴	Unfavorable ^{65,66}		
Adult			26% ³⁴	No effect
NRAS/KRAS ^{mut}				
Pediatric			10% ⁶⁹	No effect
Adult	10% ⁶⁷	Unfavorable		

Figure 61 Comparaison des altérations oncogéniques entre les LBL-T et les LAL-T

Ce tableau présente une comparaison des différentes caractéristiques biologiques entre les LAL-T et les LBL-T et l'impact pronostique rapporté pour chaque altération identifiée. (Kroeze et al., 2020)

L'analyse transcriptomique des LBL-T comparée à celle des LAL-T a mis en évidence certaines différences notables qui pourraient expliquer les caractéristiques phénotypiques

spécifiques entre ces 2 pathologies. Ainsi, l'analyse des gènes différentiellement exprimés entre les 2 hémopathies a mis en évidence une surexpression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, le chimiotactisme et l'émergence de métastases (Basso et al., 2011) (Figure 62). D'autres études rapportent également une surexpression de BCL2 mais également de S1P1 et ICAM1 dans les LBL-T, qui sont impliqués dans les mécanismes d'adhésion cellulaire, renforçant ainsi le constat que les blastes de LBL-T ont tendance à demeurer « enchâssés » dans le tissu lymphoïde où un sous-contingent blastique serait protégé de l'action de la chimiothérapie et potentiellement responsable d'une rechute ultérieure.

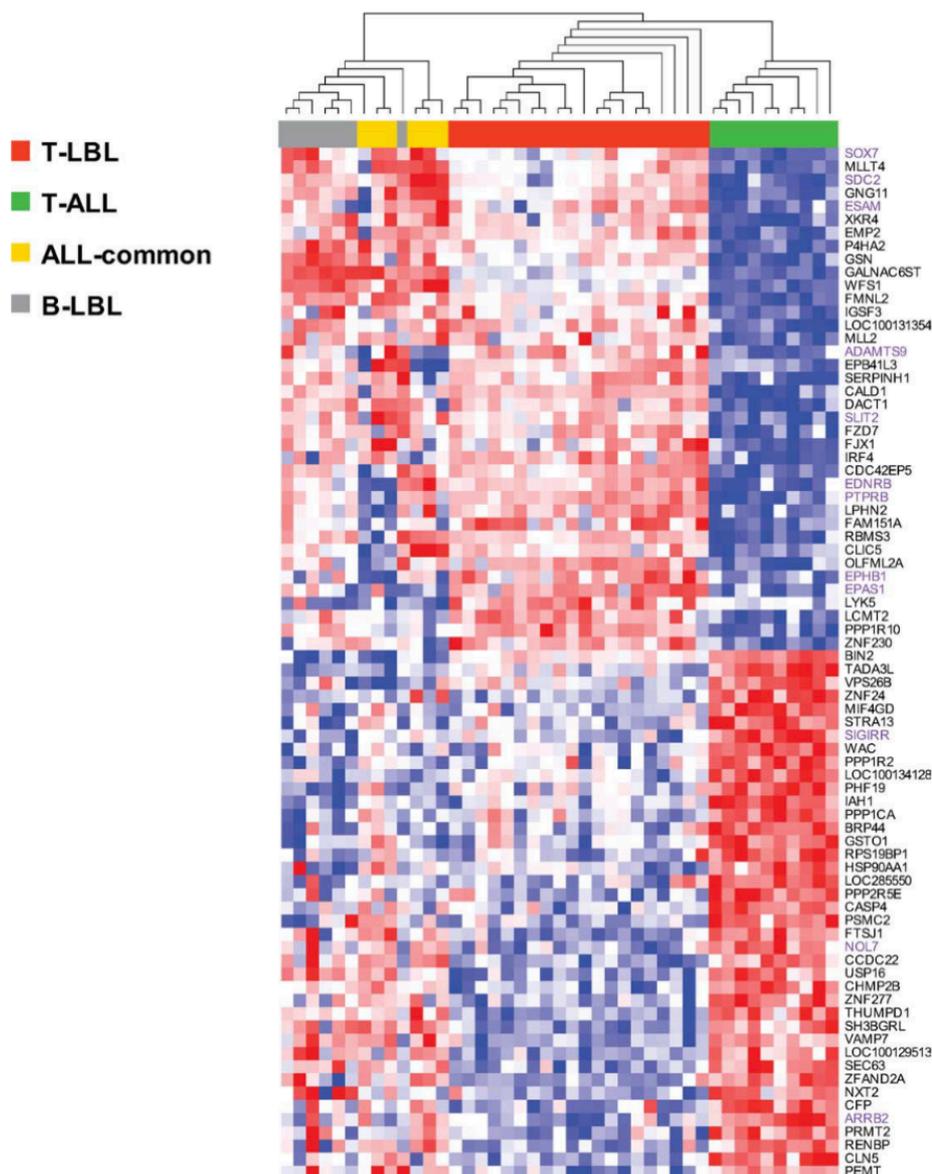


Figure 62 Analyse transcriptomique comparative LBL-T vs LAL-T

L'analyse comparative du paysage transcriptomique entre les LBL-T et les LAL-T révèle une signature transcriptomique permettant de discriminer les LAL-T des LBL-T. Ainsi, on retrouve au sein des LBL-T un enrichissement en gènes impliqués dans le chimiotactisme et l'angiogenèse (notés en violet) (Basso et al., 2011)

D'un point de vue épigénétique, une étude ayant exploré le profil de méthylation de LBL-T et celui des LAL-T et après avoir comparé ces 2 profils, a mis en évidence l'existence d'un gène spécifiquement activé dans les LBL-T par rapport au LAL-T. Il s'agit du gène SGCE (*sarcoglycan-ε*) qui est impliqué dans les processus de synthèse de la matrice du cytosquelette d'actine et sa liaison avec le milieu extracellulaire, pouvant également jouer un rôle dans le processus de présentation « lymphomateuse » des LBL-T (Borssén et al., 2016) et renforcerait l'hypothèse selon laquelle LAL-T et LBL-T doivent être considérés comme 2 entités différentes.

Au total, il existe aujourd'hui certains arguments biologiques qui plaident en faveur de l'hypothèse selon laquelle les LAL-T et les LBL-T seraient 2 entités différentes provenant probablement d'un précurseur commun mais ayant dérivé en présentation leucémique ou lymphomateuse au grès de l'acquisition d'anomalies secondaires. Sur le plan du paysage mutationnel peu de données existent à ce jour comparant avec la même méthode et dans un groupe de patients homogènes, les altérations retrouvées dans les LAL-T vs les LBL-T. Ainsi nous avons réalisé une analyse comparative des paysages mutationnel des LBL-T et des LAL-T à partir de notre large cohorte d'hémopathies T immatures composées de 476 LAL-T et de 361 LBL-T et mis en évidence pour la première fois certaines altérations spécifiquement dérégulés dans chacun des deux groupes. Certaines altérations étant également accessibles à l'utilisation de thérapies ciblées, cette étude ouvre la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques dans ces hémopathies.

II. Présentation du travail : LAL-T vs LBL-T

Dans ce travail publié dans *Modern Pathology* en 2022 nous avons étudié les différences oncogéniques existantes entre les lymphomes lymphoblastiques T (LBL-T) et les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T). Ces 2 entités partagent de nombreuses similarités, tant sur le plan clinique que biologique, ce qui explique qu'on les retrouve sous une dénomination commune dans les classifications OMS des hémopathies sous le terme "*T-lymphoblastic leukemia/lymphoma*". Peu de données existent en revanche quant à la comparaison des profils mutationnels entre ces 2 entités. A partir de l'analyse des résultats en NGS générés pour 476 LAL-T et 342 LBL-T nous avons analysé les profils d'altérations moléculaires de chacune des 2 entités afin de mettre en évidence certaines différences notables.

La médiane d'âge était comparable entre les LBL-T et les LAL-T (17 ans vs 15 ans respectivement ; $p= 0.2$). Les altérations de type *HOX* (*TLX1* et *TLX3*) étaient plus fréquentes dans les LAL-T (5% des LBL-T vs 13% des LAL-T présentaient une surexpression de *TLX1*, $p= 0.04$ et 6% des LBL-T vs 17% des LAL-T présentaient une surexpression de *TLX3*, $p= 0.006$). Les altérations de la voie PI3K/AKT/mTOR étaient significativement plus fréquentes dans les LBL-T comparées aux LAL-T (33% vs 19% ; $p<0.001$), notamment les mutations de *PIK3CA* (9% vs 2% ; $p<0.001$). Les LBL-T présentaient également un nombre plus élevé d'altérations du régulateur épigénétique *EZH2* (13% vs 8% ; $p= 0.011$) et du suppresseur de tumeur *TP53* (7% vs 2% ; $p<0.001$).

Ce travail est à ce jour l'étude la plus importante ayant permis de comparer les profils mutationnels entre LBL-T et LAL-T contribuant à préciser à la fois une grande proximité oncogénique existante entre les 2 entités mais soulignant cependant l'existence de différences significatives (notamment l'activation de la voie PI3K) qui pourrait contribuer à expliquer les profils de présentations cliniques distincts entre les deux entités.

Article IX

Titre :

Oncogenetic landscape of T-cell lymphoblastic lymphomas compared to T-cell acute lymphoblastic leukemia.

Co-auteurs :

Christophe Bontoux*, **Mathieu Simonin***, Nathalie Garnier, Ludovic Lhermitte¹, Aurore Touzart, Julie Bruneau, Nicolas Boissel, André Baruchel, Yves Bertrand, Thierry Jo Molina, Elizabeth Macintyre, Vahid Asnafi.

*co-premier auteur

État de article :

Publié

Nom de la revue :

Modern Pathology

Année de Publication :

2022

ARTICLE



Oncogenetic landscape of T-cell lymphoblastic lymphomas compared to T-cell acute lymphoblastic leukemia

Christophe Bontoux^{1,2,11}, Mathieu Simonin^{2,3,11}, Nathalie Garnier⁴, Ludovic Lhermitte⁵, Aurore Touzart², Guillaume Andrieu², Julie Bruneau⁵, Etienne Lengliné⁶, Adriana Plesa⁷, Nicolas Boissel⁸, André Baruchel⁹, Yves Bertrand¹⁰, Thierry Jo Molina⁵, Elizabeth Macintyre² and Vahid Asnafi^{2,3,23}

© The Author(s), under exclusive licence to United States & Canadian Academy of Pathology 2022

In the latest 2016 World Health Organization classification of hematological malignancies, T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LBL) and lymphoblastic leukemia (T-ALL) are grouped together into one entity called T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-LBLL). However, the question of whether these entities represent one or two diseases remains. Multiple studies on driver alterations in T-ALL have led to a better understanding of the disease while, so far, little data on genetic profiles in T-LBL is available. We sought to define recurrent genetic alterations in T-LBL and provide a comprehensive comparison with T-ALL. Targeted whole-exome next-generation sequencing of 105 genes, multiplex ligation-dependent probe amplification, and quantitative PCR allowed comprehensive genotype assessment in 818, consecutive, unselected, newly diagnosed patients (342 T-LBL vs. 476 T-ALL). The median age at diagnosis was similar in T-LBL and T-ALL (17 vs. 15 years old, respectively; $p = 0.2$). Although we found commonly altered signaling pathways and co-occurring mutations, we identified recurrent dissimilarities in actionable gene alterations in T-LBL as compared to T-ALL. *HOX* abnormalities (*TLX1* and *TLX3* overexpression) were more frequent in T-LBL vs 13% of T-ALL had *TLX1* overexpression; $p = 0.04$ and 6% of T-LBL vs 17% of T-ALL had *TLX3* overexpression; $p = 0.006$). The PI3K signaling pathway was significantly more frequently altered in T-LBL as compared to T-ALL (33% vs 19%; $p < 0.001$), especially through *PIK3CA* alterations (9% vs 2%; $p < 0.001$) with *PIK3CA*^{H1047} as the most common hotspot. Similarly, T-LBL genotypes were significantly enriched in alterations in genes coding for the *EZH2* epigenetic regulator and in *TP53* mutations (respectively, 13% vs 8%; $p = 0.016$ and 7% vs 2%; $p < 0.001$). This genetic landscape of T-LBLL identifies differential involvement of recurrent alterations in T-LBL as compared to T-ALL, thus contributing to better understanding and management of this rare disease.

Modern Pathology; <https://doi.org/10.1038/s41379-022-01085-9>

INTRODUCTION

Precursor T-cell malignancies are rare clonal hematopoietic stem cell neoplasms of lymphoid precursors that are committed to the T-cell lineage and mainly affect pediatric patients. By convention, the designation of T-cell lymphoblastic lymphoma (T-LBL) is used when the neoplasm is confined to a tissue lesion without or with only minimal blood or bone marrow involvement while T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) is used when there is extensive blood involvement and/or >25% bone marrow infiltration. The World Health Organization denominated both T-ALL and T-LBL as T-lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-LBLL) in the 2016 Revised World Health Organization classification of hematological malignancies but without further specification¹. Despite this, similarities and differences in T-LBL and T-ALL regarding clinical course,

phenotypic and molecular features have raised the question of whether these entities represent one disease or reflect two different diseases². Molecular aspects of T-ALL have been widely explored and, although T-ALL and T-LBL share several common aberrations, clinical and multiomic strategies suggested that the two entities may have independent pathogenic requirements and dependencies³. Evidence that leukemic conversion originating from the T-LBL cell in lymphoid tissue can occur has been reported^{4,5}. About 40% of relapsed T-LBL patients have bone marrow (BM) involvement, whereas less than 20% of T-LBL patients have histological evidence of BM involvement at diagnosis⁵. Conversely, about 20% of ALL patients undergo isolated extramedullary relapse (mainly central nervous system or testis) that could be considered lymphoma⁶. Gene expression

¹Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, FHU OncoAge, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Université Côte d'Azur, 06000 Nice, France. ²Laboratory of Onco-Hematology, Hôpital Necker Enfants-Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université de Paris, Institut Necker-Enfants Malades (INEM), Institut National de recherche Médicale (INSERM) U1151, Paris, France. ³Department of Pediatric Hematology and Oncology, Armand Trousseau Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Sorbonne Université, Paris, France. ⁴Institute of Pediatric Hematology and Oncology, Hospices Civils de Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France. ⁵Department of Pathology, Hôpital Necker Enfants-Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université de Paris, Paris, France. ⁶Hematology Department, Saint-Louis Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université de Paris, Paris, France. ⁷Laboratory of Hematology and Flow Cytometry, CHU Lyon-Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ⁸Adolescent and Young Adult Hematology Unit, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Saint-Louis Hospital, Paris, France. ⁹Pediatric Hematology and Immunology Department, Robert Debré Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France. ¹⁰Institute of Pediatric Haematology and Oncology, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ¹¹These authors contributed equally: Christophe Bontoux, Mathieu Simonin. ²³email: vahid.asnafi@aphp.fr

Received: 16 February 2022 Revised: 8 April 2022 Accepted: 8 April 2022
Published online: 13 May 2022

analysis of T-LBL and T-ALL patient samples also showed different signatures for T-LBL and T-ALL in both children and adults, implying specific requirements to invade lymphoid tissues (T-LBL) or involve systemic compartments (T-ALL)^{7,8}. Genes involved in angiogenesis, chemotactic response, and nodal metastases were more highly expressed in T-LBL⁷. Genes coding for proteins involved in cell-cell adhesion such as *BCL2*, *S1P1*, and *ICAM1* have also been shown to be differentially expressed in T-LBL, leading to a blockade of tumor cell intravasation to blood⁹. This may explain why T-LBL and stromal cells are embedded in close proximity to lymphoid tissues. Phenotypically, it has been reported that T-LBL more frequently involves mature thymic cells than T-ALL, with a less frequent expression of myeloid antigens^{10–12}. Finally, one DNA methylation study identified an epigenetic signature of differentially methylated CpG sites that segregates T-LBL from T-ALL. Those sites were associated with increased expression of membrane-associated protein domains¹³.

Understanding the significance of gene mutations in the diagnostic or prognosis of T-LBL has already helped risk stratification and the development of individualized treatment¹⁴. T-ALL and T-LBL, however, remain highly aggressive malignant tumors, notably in adults. Despite event-free survival (EFS) rates of up to 50–90%, the overall survival rate after relapse is only ~3–27%^{15–20}. A precise description of the genetic landscape of T-LBL and specifically T-LBL is therefore desirable, in order to identify potential therapeutic targets and improve survival rates while reducing acute and long-term toxicities.

In this study, we analyzed the genetic landscape of 818 T-LBL and identified significant differences in the incidence of *PI3K/Akt*, *EZH2*, and *TP53* gene alterations between T-LBL and T-ALL. These alterations affect specific signaling pathways and may confer a susceptibility to recently developed targeted therapies.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Diagnostic peripheral blood, bone marrow, or lymphoid tissue samples from 818 unselected adults and children with T-LBL (476 patients with T-ALL and 342 with T-LBL), newly diagnosed between 1999 and 2020, were analyzed centrally in Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP, Paris France) after informed consent was obtained at diagnosis according to the Declaration of Helsinki. According to WHO criteria, if a patient presents with a mass lesion and lymphoblasts in the marrow, a value of >25% marrow blasts is used to define leukemia versus lymphoma¹.

Gene mutation screening

A custom capture Nextera XT gene panel (Illumina, San Diego, CA) targeting all coding exons and their adjacent splice junctions of 105 genes was designed, based on available evidence in hematological neoplasms (Supplementary Table 2). DNA Libraries were prepared using Nextera Rapid Capture Enrichment protocol and underwent 2 × 150 bp paired-end sequencing on Illumina MiSeq sequencing system with MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). Briefly, sequence reads were filtered and mapped to the human genome (GRCh37/hg19) using in-house software (Polyweb, Institut Imagine, Paris). Annotated variants were selected after filtering out calls according to the following criteria: (1) coverage < 30×, < 10 alternative reads or variant allelic fraction (VAF) < 7%; (2) polymorphisms described in dbSNP, 1000Genomes, EVS, Gnomad and EXAC with a calculated mean population frequency > 0.1%; (3) mutations with a frequency < 2% in both T-LBL and T-ALL groups. Non-filtered variants were annotated using the somatic database COSMIC (version 78) and ProteinPaint (St Jude Children's Research Hospital—Pediatric Cancer data portal). Lollipop plots were generated with ProteinPaint (<https://pecan.stjude.org/#/proteinpaint>) and splice mutations were not depicted.

Molecular characterization of oncogenic drivers in T-LBL samples

Peripheral blood, bone marrow T-ALL samples, and lymphoid tissue T-LBL samples when available were analyzed for fusion transcripts (*SIL-TAL1*, *CALM-AF10/PICALM-MLLT10*), oncogenic transcripts (*HOXA9*, *TLX1*, and *TLX3*) and *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN* mutations, as previously described^{21,22}.

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis

MLPA analysis was performed using the MRC Holland (Amsterdam, The Netherlands) SALSA MLPA probe mix P383-A1 TALL according to the manufacturer's recommendations. Polymerase chain reaction products were separated by capillary electrophoresis on an ABI-3130 device. Coffalyser software, available at <http://www.mlpa.com>, was used for the analysis.

Statistics

Comparisons for categorical variables between T-ALL and T-LBL subgroups were performed with Fisher's exact test or Wilcoxon rank-sum test. Statistical analyses were performed with STATA software (STATA 12.0 Corporation, College Station, TX, USA) and StatAid R package²³. All *p*-values were two-sided, with *p* < 0.05 denoting statistical significance. Circos plots and oncoplots were generated using R software. Strong correlations are indicated by large ellipses, whereas weak correlations are indicated by small ellipses. Co-occurrences and mutual exclusions in T-LBL and T-ALL patients were computed with the DISCOVER algorithm (version 0.9.3).

RESULTS

Clinico-genomic comparison between T-ALL and T-LBL shows common features

Eight hundred and eighteen adults and children with T-LBL (342 with T-LBL and 476 patients with T-ALL) were included in the study. Among the 476 T-ALL analyzed, 215 were adult patients (≥19 years old) and 261 were pediatric patients (<19 years old). Among the 342 T-LBL analyzed, 156 were adult patients (≥19 years old) and 186 were pediatric patients (<19 years old) (Supplementary Table 1). The median age at diagnosis was similar in T-LBL and T-ALL (17[1–72] vs 15[1–59] years old, respectively, (*p* = 0.2). 74% (249/335) of T-LBL vs 75% (357/476) of T-ALL were male (*p* > 0.9). CNS involvement occurred in 6% of T-LBL vs 11% of T-ALL (*p* = 0.11). Regarding oncogenetic classification, *CALM-AF10* (*PICALM-MLLT10*) rearrangements were found in 4% of T-LBL vs 3% of T-ALL (*p* = 0.8). *SIL-TAL1* rearrangements were also comparable in both groups (13% of T-LBL vs 14% of T-ALL; *p* > 0.9). Clinico-biological features of the cohort are summarized in Table 1.

Of the 818 T-LBL samples, 804 harbored at least one pathogenic mutation or MLPA alteration (330/96.5% T-LBL and 474/99.6% T-ALL). The global representation of the mutation landscape in T-LBL and T-ALL is displayed as an oncoplot (Fig. 1A). Circos plots depicting co-occurring mutations in T-LBL and T-ALL are shown in Fig. 1B.

Most alterations in T-LBL affected *NOTCH1/FBXW7* pathway genes (68% of cases), which was the most frequently involved pathway in both T-LBL and T-ALL. The second most frequently altered pathway was the cell cycle, with *CDKN2A* being deleted in 50% of T-LBL vs. 70% of T-ALL. Epigenetic regulating factors were commonly altered in both categories (53% overall). Other signaling pathways, including *PI3K*, *JAK/STAT*, and *RAS* (including *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, and *PTPN11*), were also commonly altered in T-LBL and T-ALL. Genes coding for transcription factors were similarly mutated in T-LBL (40% of cases) and in T-ALL (44% of cases); *p* = 0.277 (Fig. 1A and supplementary Table 3).

Co-occurring gene alterations were also comparable between T-LBL and T-ALL (Fig. 1B). *NOTCH1* mutations frequently co-occurred with *CDKN2A* deletions, *FBXW7*, *PHF6*, and *BCL11B* mutations and are significantly less associated with *PTEN* alterations.

A thorough, comprehensive genetic landscape analysis of T-LBL, however, identified recurrent dissimilarities in oncogene alterations as compared to T-ALL.

Molecular dissimilarities in T-LBL vs T-ALL

Several oncogenes were significantly differentially distributed and are described below. Gene and pathway alterations in T-LBL and T-ALL are depicted and detailed in Fig. 2 and supplementary Table 3. Regarding oncogenic drivers, *NKL* homeotic abnormalities

Table 1. Characteristics of the cohort.

Variable	Overall ^a (n = 818)	LBLT ^a (n = 342)	TALL ^a (n = 476)	p-value ^b
Age (y)				0.2
Median [range]	16 (1–72)	17 (1–72)	15 (1–59)	
Adult	371 (45)	156 (46)	215 (45)	
Ped	447 (55)	186 (54)	261 (55)	
Sex				>0.9
Female	208 (25)	89 (26)	119 (25)	
Male	610 (75)	253 (74)	357 (75)	
CNS involvement				0.11
No	525/582 (90)	102/108 (94)	423/474 (89)	
Yes	57/582 (10)	6/108 (6)	51/474 (11)	
Oncogenic drivers				
CALM-AF10 (PICALM-MLLT10)	17/529 (3)	4/106 (4)	13/415 (3)	0.8
TLX1	60/529 (11)	6/106 (6)	54/415 (13)	<i>0.04</i>
TLX3	79/529 (15)	7/106 (7)	72/415 (17)	<i>0.006</i>
SIL-TAL1	73/529 (14)	16/106 (15)	57/415 (14)	>0.9

P-values in italic are <0.05.

^an / N (%).

^bFisher's exact test; Wilcoxon rank-sum test.

(*TLX1* and *TLX3*) were more frequent in T-ALL as compared to T-LBL. *TLX1* overexpression was found in 6% of T-LBL vs. 13% of T-ALL ($p = 0.04$) and *TLX3* overexpression in 7% of T-LBL vs. 17% of T-ALL ($p = 0.006$).

NOTCH1/FBXW7 pathway. *NOTCH1* alterations were identified in 52% (170/330) of T-LBL patients versus 72% (342/474) of T-ALL ($p < 0.001$). Mutations mainly clustered in the *NOTCH1* HD domain (56% of *NOTCH1* mutations in T-LBL vs 42% of T-ALL; $p = 0.086$) (Supplementary Table 4). *FBXW7* mutations were found in 24% of T-LBL vs 20% of T-ALL ($p = 0.226$). However, the co-occurrence mutational profile of *FBXW7* differs between T-LBL and T-ALL. *FBXW7* mutations were significantly more commonly associated with *PTEN* and *STAT5B* alterations in T-LBL while *FBXW7* mutations were more commonly associated with *JAK1* and *RUNX1* mutations in T-ALL (Fig. 3).

Cell cycle. We observed significantly fewer *CDKN2A* alterations in T-LBL (50% of T-LBL vs 70% of T-ALL; $p < 0.001$). Conversely, T-LBL were enriched in *TP53* mutations (7% of T-LBL vs 2% of T-ALL; $p < 0.001$). *TP53* mutations had no significant co-occurrence with other gene alterations in T-ALL whereas they were less significantly associated with *CDKN2A* deletions in T-ALL (Fig. 3). *TP53* mutations mainly affected the p53 DNA-binding domain of the protein (exon 5–8) in both T-LBL and T-ALL (Fig. 4A). No differential incidence of mutations between adult and pediatric T-LBL regarding *TP53* was found (Supplementary Table 5).

Epigenetic deregulation. Epigenetic regulating factors were more frequently altered in T-ALL (52% of T-LBL vs 60% of T-ALL cases; $p = 0.02$). *PHF6* was the most frequently altered gene in this category, with mutations detected in 29% (232/804) of patients (71/330, 22% of T-LBL vs 161/474, 34% of T-ALL; $p < 0.001$). T-ALL patients were significantly enriched in *CTCF* and *EED* mutations as compared to T-LBL (respectively, 1% of T-LBL vs 5% of T-ALL; $p = 0.001$ and 1% of T-LBL vs 4% of T-ALL; $p = 0.002$). In addition, T-LBL patients were enriched in *EZH2* alterations (43/330, 13% of T-LBL vs 36/474, 8% of T-ALL; $p = 0.016$).

The main alterations were deletions (28% of *EZH2* alteration in T-LBL vs 31% in T-ALL) and missense mutations (42% in T-LBL vs 25% in T-ALL) (Supplementary Table 4). Of note, *EZH2* alterations were

significantly less commonly associated with *NOTCH1* and *FBXW7* mutations in T-LBL (Fig. 3A). Mutations were mainly located in exons 16 to 20 in T-ALL and in T-LBL, affecting the SET domain of the protein (Fig. 4B).

Finally, *KMT2D* was mutated in 14% of T-LBL vs 8% of T-ALL ($p = 0.001$). The distribution of *KMT2D* variants in adult and pediatric patients is pictured in Supplementary Fig. 1. No differential incidence of alterations between adult and pediatric T-LBL regarding *EZH2* or *KMT2D* was found (Supplementary Table 5).

JAK/STAT signaling pathways. The JAK/STAT signaling pathway was significantly more affected in T-ALL vs T-LBL (207/474, 43% vs 110/330, 33%, respectively; $p = 0.004$), partly due to the higher incidence of *DNM2* mutations in T-ALL (70/474, 15% of T-ALL vs 23/330, 7% of T-LBL; $p < 0.001$). Regarding other major genes involved in JAK/STAT signaling, *IL7R*, *JAK1*, *JAK3*, and *STAT5B* were mutated in 10%, 6%, 14%, and 6% in T-LBL, respectively, with no incidence difference between T-LBL and T-ALL (Fig. 1A and Supplementary Table 3).

PI3K signaling pathway. Evaluation of PI3K signaling pathway gene mutations in T-LBL highlights important dissimilarities with T-ALL. Overall, 5% (38/804) of patients had *PIK3CA* mutations (30/330, with 9% in T-LBL vs 8/474, 2% in T-ALL; $p < 0.001$), comprising 39 mutations (31 in T-LBL and 8 in T-ALL). Of these, 38 were missense mutations and one was a nonsense mutation. Interestingly, the most frequent mutation of *PIK3CA* in T-LBL was missense mutation at H1047 in exon 21 (kinase domain) (11/31 mutations, 35%) while T-ALL featured scattered mutations without preferential location. *PIK3CA* mutations are depicted in Fig. 4C and detailed in Supplementary Table 6. While no significant co-occurrence between *PIK3CA* and other gene alterations was reported in T-ALL, *PIK3CA* mutations were significantly less associated with *NOTCH1*, *PHF6*, *PTEN*, and *JAK3* alterations in T-LBL (Fig. 3).

PIK3R1 mutations were observed in 5% (42/804) of patients (24/330, 7% of T-LBL vs 18/474, 4% of T-ALL; $p = 0.036$) with 43 mutations reported (25 in T-LBL and 18 in T-ALL) featuring 25 missense, 11 indels, 3 frameshifts, and 4 splicing mutation. Most of the mutations observed were in the Inter-Src homology 2 (iSH2) helical domain of the protein, especially in exon 13. *PIK3R1* mutations were significantly less associated with *NOTCH1*, *PHF6*,

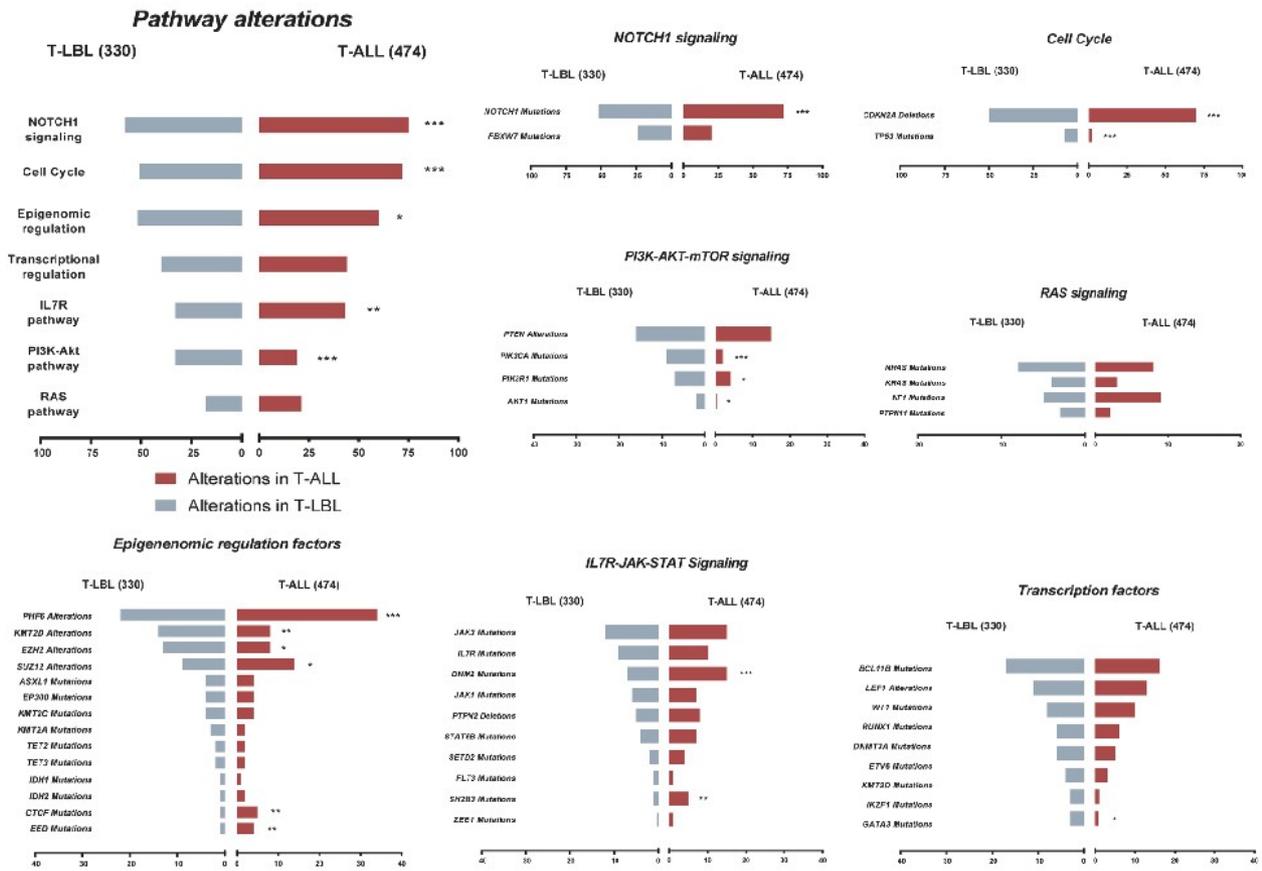


Fig. 2 Bar plots featuring the incidence of signaling pathway and gene alterations in T-ALL (red bars) versus T-LBL (gray bars). The significance level of co-occurrences or mutual exclusions are depicted as followed: * indicating a p -value < 0.05, ** a p -value < 0.01, and *** a p -value < 0.001.

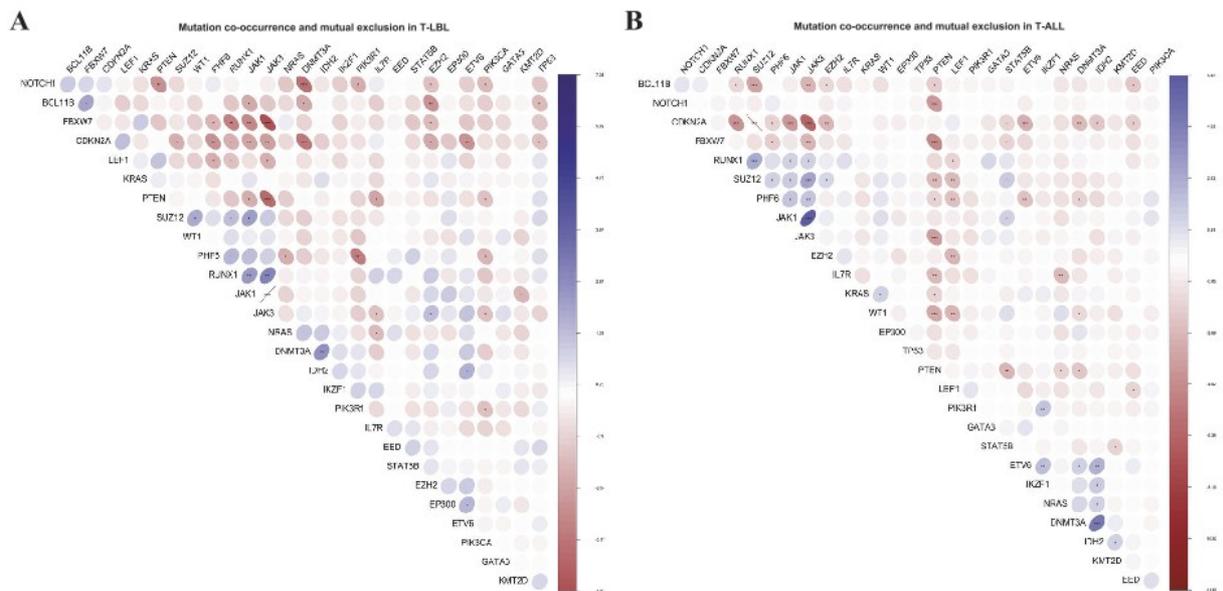


Fig. 3 Mutation co-occurrence and mutual exclusion in T-LBL and T-ALL. Corplot showing the co-mutations in: **A** T-LBL patients and **B** T-ALL patients. The colors of the scale bar denote the nature of the correlation, with +1 indicating a perfectly positive correlation (blue) and -1 indicating a perfectly negative correlation (red) between two alterations. The significance level of co-occurrences or mutual exclusions are depicted as followed: * indicating a p -value < 0.05, ** a p -value < 0.01, and *** a p -value < 0.001.

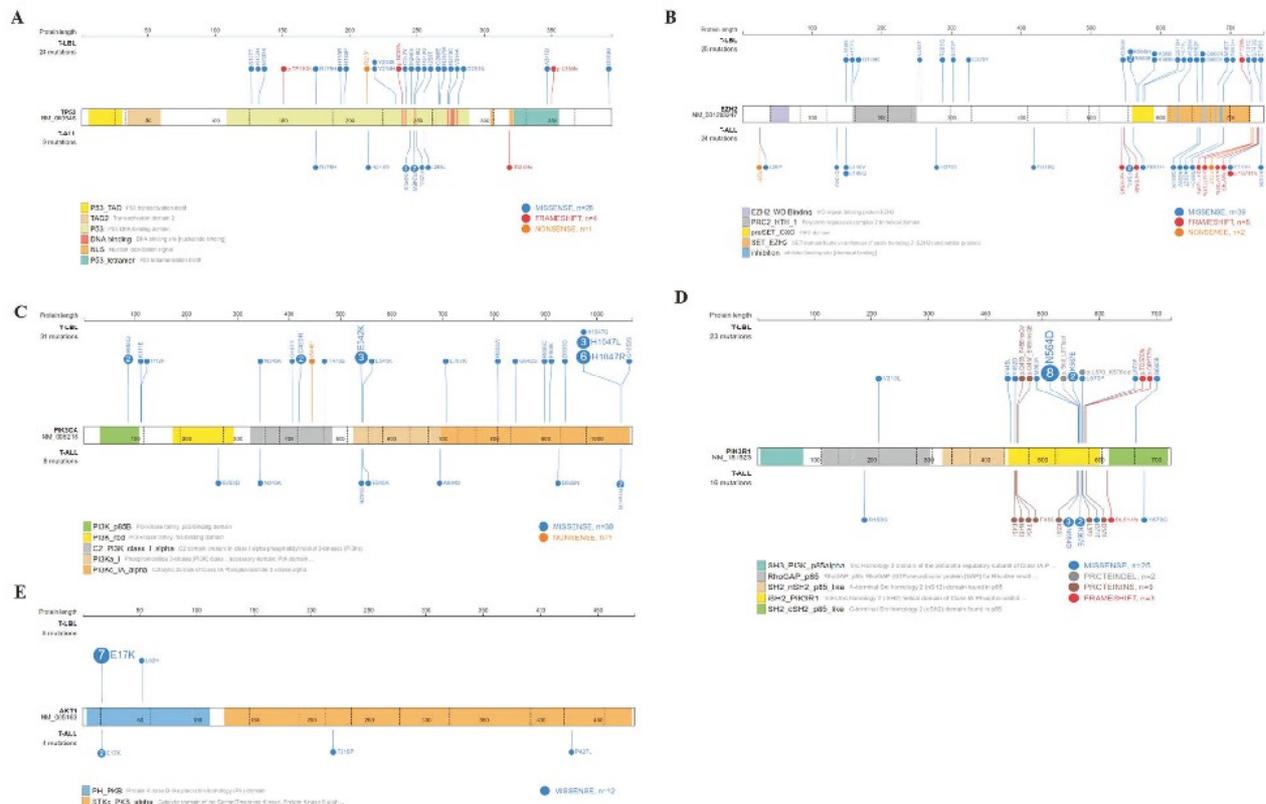


Fig. 4 Representation and distribution of mutations observed in T-LBL confront to T-ALL for selected genes. Lollipop plots indicating the observed mutations and their consequences for: **A** TP53. **B** EZH2. **C** PIK3CA. **D** PIK3R1. **E** AKT1.

Most importantly, NGS-based molecular screening reveals recurrent PI3K signaling pathway alterations in T-LBL as compared to T-ALL. Nine percent of T-LBL patients had *PIK3CA* mutations, mainly involving exons 10 and 21. This is slightly higher than previously reported in pediatric and adult T-LBL cohorts (7% and 6%, respectively)^{27,28}. *PIK3R1* mutations in our cohort were also higher compared to previous observations (7% vs 4%)²⁷. Regarding T-ALL, there were few *PIK3CA* (2%), *PIK3R1* (4%), and *AKT1* (0.4%) mutations, which is consistent with the literature, although slightly lower than previously reported, albeit limited, cohorts^{29,30}. A recent NGS-based study of 87 adult T-LBL did not identify significant *PIK3CA*, *PIK3R1*, or *AKT1* mutations³¹. *PIK3CA* mutations were significantly less associated with *NOTCH1*, *PHF6*, and *PTEN* alteration in T-LBL, suggesting a specific oncogenic role. The PI3K/Akt signaling pathway plays an important role in the early stages of thymocyte development, specifically for the transition of double-negative to double-positive thymocytes. Whereas a loss of regular PI3K/Akt signaling leads to defective thymocyte development, its aberrant activation triggers uncontrolled cell survival, growth, and proliferation that may lead to the formation of T-cell lymphomas³². The PI3K/Akt pathway also has a crucial role in cell-to-cell adhesion and is implicated in tumor-induced extracellular matrix reorganization and tumor dissemination^{33–36}. We hypothesize that activating mutations in this pathway might affect thymocyte-stroma interaction to promote tumor formation and dissemination preferentially in T-LBL. Clinically, specific inhibition of *PIK3CA* in *PIK3CA*-related overgrowth CLOVES syndrome patients induces spectacular disease regression³⁷. Interestingly, the 19 T-LBL patients in this cohort showed a spectrum of mutations very similar to those reported in this study, with *PIK3CA*^{H1047} as the most frequent alteration (Fig. 4C). PI3K/Akt pathway alterations and specifically *PIK3CA* alterations are frequent targetable lesions in solid tumors. Promising clinical trials have led to FDA approval for alpelisib in metastatic breast cancer³⁸.

Our results show that mutations in the PI3K/Akt signaling pathway are recurrent features and potentially actionable targets in T-LBL.

Additional genomic differences between T-LBL and T-ALL affect *NOTCH1*, *CDKN2A* genes, and epigenetic regulating factors. *NOTCH1* mutations affect the HD or TAD/PEST domain of the protein, resulting in increased *NOTCH1* signaling. These mutations have been widely described in T-ALL, when they are found in up to 70% of diagnostic samples^{39,40}. *NOTCH* pathway mutations in T-ALL have been associated with a favorable outcome and improved steroid responses^{41,42}. *NOTCH1* mutations have been reported in 55–60% of pediatric T-LBL^{2,28,43} and 36–52% of adult T-LBL^{31,44}, while we now report *NOTCH1* mutations in 52% of T-LBL patients. These mutations were also associated with a favorable prognostic effect^{31,43}. Interestingly, T-ALL were significantly enriched in *NOTCH1* mutations as compared to T-LBL, particularly those leading to single in-frame mutations, which were absent in T-LBL, compared to 17% of T-LBL.

With respect to epigenetic abnormalities, the *EZH2* gene was more frequently mutated in T-LBL. In previous studies, *EZH2* was mutated in 7% of T-ALL adult cases while *EZH2* gain was observed in 13% of T-LBL pediatric cases with SNP array^{28,31}. Loss-of-function *EZH2* mutations were found in T-ALL, along with deletions and mutations of other Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) subunits^{45–47}. *EZH2* is the functional enzymatic component of PRC2 and is responsible for its methylation activity. PRC2 loss-of-function alterations can profoundly reshape the genetic and epigenetic landscape of T-ALL, leading to the reactivation of stem cell programs that cooperate with Bromodomain and Extraterminal (BET) proteins to sustain T-ALL. We recently identified a targetable vulnerability to BET inhibition in PRC2-altered T-ALL patients⁴⁷. The present data suggest that *EZH2*-altered T-LBL patients should also be considered for such targeted therapy. On the other hand, other mutations in

PRC2 subunits (i.e., *SUZ12*) and in epigenetic factor *PHF6* were enriched in T-ALL. Similar to what has been reported, *SUZ12* inactivation and *PHF6* alterations significantly co-occurred with *JAK3* mutations in our T-ALL patients as compared to T-LBL^{48,49}. Based on our results, selective PRC2 subunits alterations seem to be preferentially associated with leukemic or tumoral involvement and should be further explored. In the same manner, *PHF6* gene does not seem to play a major role in lymphomagenesis as compared to what has been reported in T-ALL⁵⁰. In contrast to T-ALL cell lines, *PHF6* mutations have been associated with a favorable outcome in adult T-LBL patients³¹. The role *PHF6* plays in leukemogenesis is still actively under investigation and further study is therefore required to assess its true role and significance in T-LBLL patients.

Intriguingly, we found a higher incidence of *KMT2D* mutation, another epigenetic modifier, in T-LBL vs T-ALL. *KMT2D* have been previously shown to be associated with poor prognosis in pediatric T-LBL²⁸. We reported a similar *KMT2D* mutation incidence (14% vs 13%) in T-LBL, but we did not observe a differential incidence of *KMT2D* mutation in pediatric vs. adult patients. In addition, we found that mutations in T-LBL were rather localized in a region ranging from 2000 to 3000 amino acids, as previously described, and, specifically to our cohort, in exon 11. For T-ALL, we found 8% of patients with *KMT2D* mutation which is higher than data previously reported, albeit in limited cohorts of purely pediatric patients (2% and 3%)^{51,52}. Although *KMT2D* gene has been very little studied in T-LBLL, it seems to have an important role in leukemogenesis specifically in T-LBL. Because of a heterogenous distribution of mutations, further studies are needed for better characterization.

T-LBL were also highly enriched in *TP53* missense mutations as compared to T-ALL. *TP53* is the most commonly mutated somatic gene in human cancer and is often associated with a poor outcome in hematological malignancies⁵³. The *TP53* targeting drug APR 246 (eprinetapopt) has recently shown promising results in myeloid malignancies with mutant *TP53*^{54,55}. APR 246 is a small molecule that restores wild-type p53 functions in *TP53*-mutant cells and could be part of the future of care in T-LBL/T-ALL harboring *TP53* Mutation.

The JAK/STAT signaling pathway was frequently altered in T-LBLL (39% of cases), particularly in T-ALL, with *JAK3* as the main mutated gene in both T-LBL (12%) and T-ALL (15%). The incidence of *IL7R* was frequent and similar in T-LBL and T-ALL (about 10%). *IL7R*/*JAK*/*STAT* pathway alterations are known to participate in leukemic development and are associated with reduced steroid sensitivity and poor clinical outcome⁵⁶, although this may improve with targeted use of JAK inhibitors (tofacitinib and ruxolitinib)^{57–59}.

In conclusion, we provide the largest comparative study exploring the oncogenic landscape of T-LBL vs T-ALL and reveal for the first time significant preferential alterations in T-LBL vs T-ALL (PI3K/Akt pathway, *TP53*, and *PRC2*/*EZH2* alterations) using a pan-exon NGS-based approach. We identified recurrent mutations in targetable oncogenic signaling pathways in T-LBL and suggest that certain somatic abnormalities may affect the degree of tissue dissemination to blood and or bone marrow. Nevertheless, further prospective studies in T-LBL and T-ALL patients homogeneously treated are needed to better characterize the impact of genomic alterations in these rare diseases.

DATA AVAILABILITY

Data will be made publicly available.

REFERENCES

- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).

- Kroeze, E., Loeffen, J. L. C., Poort, V. M. & Meijerink, J. P. P. T-cell lymphoblastic lymphoma and leukemia: different diseases from a common premalignant progenitor? *Blood Adv* **4**, 3466–3473 (2020).
- van der Zwet, J. C. G., Cordo, V., Canté-Barrett, K. & Meijerink, J. P. P. Multi-omic approaches to improve outcome for T-cell acute lymphoblastic leukemia patients. *Adv Biol Regul* **74**, 100647 (2019).
- Burkhardt, B., Zimmermann, M., Oschlies, I., Niggli, F., Mann, G., Parwaresch, R. et al. The impact of age and gender on biology, clinical features and treatment outcome of non-Hodgkin lymphoma in childhood and adolescence. *Br J Haematol* **131**, 39–49 (2005).
- Burkhardt, B., Reiter, A., Landmann, E., Lang, P., Lassay, L., Dickerhoff, R. et al. Poor outcome for children and adolescents with progressive disease or relapse of lymphoblastic lymphoma: a report from the Berlin-Frankfurt-Muenster group. *J Clin Oncol* **27**, 3363–3369 (2009).
- Hagedorn, N., Acquaviva, C., Fronkova, E., Von Stackelberg, A., Barth, A., Zur Stadt, U. et al. Submicroscopic bone marrow involvement in isolated extramedullary relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: a more precise definition of “isolated” and its possible clinical implications, a collaborative study of the Resistant Disease Committee of the International BFM study group. *Blood* **110**, 4022–4029 (2007).
- Basso, K., Mussolin, L., Lettieri, A., Brahmachary, M., Lim, W. K., Califano, A. et al. T-cell lymphoblastic lymphoma shows differences and similarities with T-cell acute lymphoblastic leukemia by genomic and gene expression analyses. *Genes Chromosomes Cancer* **50**, 1063–1075 (2011).
- Bonn, B. R., Hüge, A., Rohde, M., Oschlies, I., Klapper, W., Voss, R. et al. Whole exome sequencing hints at a unique mutational profile of paediatric T-cell lymphoblastic lymphoma. *Br J Haematol* vol. 168 308–313 (2015).
- Feng, H., Stachura, D. L., White, R. M., Gutierrez, A., Zhang, L., Sanda, T. et al. T-lymphoblastic lymphoma cells express high levels of BCL2, S1P1, and ICAM1, leading to a blockade of tumor cell intravasation. *Cancer Cell* **18**, 353–366 (2010).
- Patel, J. L., Smith, L. M., Anderson, J., Abromowitch, M., Campana, D., Jacobsen, J. et al. The immunophenotype of T-lymphoblastic lymphoma in children and adolescents: A children’s oncology group report. *Br J Haematol* **159**, 454–461 (2012).
- Bernard, A., Boumsell, L., Reinherz, E., Nadler, L., Ritz, J., Coppin, H. et al. Cell surface characterization of malignant T cells from lymphoblastic lymphoma using monoclonal antibodies: evidence for phenotypic differences between malignant T cells from patients with acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma. *Blood* **57**, 1105–1110 (1981).
- Uyttebroeck, A., Vanhentenrijk, V., Hagemeyer, A., Boeckx, N., Renard, M., Wlodarska, I. et al. Is there a difference in childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia and T-cell lymphoblastic lymphoma? *Leuk Lymphoma* **48**, 1745–1754 (2007).
- Haider, Z., Landfors, M., Golovleva, I., Erlanson, M., Schmiegelow, K., Flægstad, T. et al. DNA methylation and copy number variation profiling of T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Blood Cancer J* **10**, 45 (2020).
- Terwilliger, T. & Abdul-Hay, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* **7**, e577 (2017).
- Pillon, M., Pigiore, M., Garaventa, A., Conter, V., Giuliano, M., Arcamone, G. et al. Long-term results of AIEOP LNH-92 protocol for the treatment of pediatric lymphoblastic lymphoma: a report of the Italian association of pediatric hematology and oncology. *Pediatr Blood Cancer* **53**, 953–959 (2009).
- Goldberg, J. M., Silverman, L. B., Levy, D. E., Dalton, V. K., Gelber, R. D., Lehmann, L. et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: The Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium experience. *J Clin Oncol* vol. 21 3616–3622 (2003).
- Sandlund, J. T., Pui, C. H., Zhou, Y., Behm, F. G., Onciu, M., Razzouk, B. I. et al. Effective treatment of advanced-stage childhood lymphoblastic lymphoma without prophylactic cranial irradiation: Results of St Jude NHL13 study. *Leukemia* **23**, 1127–1130 (2009).
- Huguet, F., Chevret, S., Leguay, T., Thomas, X., Boissel, N., Escoffre-Barbe, M. et al. Intensified therapy of acute lymphoblastic leukemia in adults: Report of the randomized GRAALL-2005 clinical trial. *J Clin Oncol* **36**, 2514–2523 (2018).
- Oudot, C., Auclerc, M. F., Levy, V., Porcher, R., Pigué, C., Perel, Y. et al. Prognostic factors for leukemic induction failure in children with acute lymphoblastic leukemia and outcome after salvage therapy: The FRALLE 93 study. *J Clin Oncol* **26**, 1496–1503 (2008).
- Burkhardt, B., Taj, M., Garnier, N., Minard-Colin, V., Hazar, V., Mellgren, K. et al. Treatment and outcome analysis of 639 relapsed non-hodgkin lymphomas in children and adolescents and resulting treatment recommendations. *Cancers* **13**, 2075 (2021).
- Trinquand, A., Tanguy-Schmidt, A., Abdelali, R. Ben, Lambert, J., Beldjord, K., Lengliné, E. et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-Cell acute lymphoblastic leukemia: a group for research in adult acute lymphoblastic leukemia study. *J Clin Oncol* **31**, 4333–4342 (2013).

22. Bond, J., Marchand, T., Touzart, A., Cieslak, A., Trinquand, A., Sutton, L. et al. An early thymic precursor phenotype predicts outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: A group for research in adult acute lymphoblastic leukemia study. *Haematologica* **101**, 732–740 (2016).
23. Alcazer, V. StatAid: An R package with a graphical user interface for data analysis. *J. Open Source Softw* **5**, 2630 (2020).
24. Dadi, S., Le Noir, S., Payet-Bornet, D., Lhermitte, L., Zacarias-Cabeza, J., Bergeron, J. et al. TLX Homeodomain Oncogenes Mediate T Cell Maturation Arrest in T-ALL via Interaction with ETS1 and Suppression of TCR α Gene Expression. *Cancer Cell* **21**, 563–576 (2012).
25. Cavé, H., Suci, S., Preudhomme, C., Poppe, B., Robert, A., Uytendaele, A. et al. Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: Results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood* **103**, 442–450 (2004).
26. Ballerini, P., Landman-Parker, J., Cayuela, J. M., Asnafi, V., Labopin, M., Gandemer, V. et al. Impact of genotype on survival of children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the French protocol FRALLE-93: the effect of TLX3/HOX11L2 gene expression on outcome. *Haematologica* **93**, 1658–1665 (2008).
27. Balbach, S. T., Makarova, O., Bonn, B. R., Zimmermann, M., Oschlies, I., Klapper, W. et al. Proposal of a genetic classifier for risk group stratification in pediatric T-cell lymphoblastic lymphoma reveals differences from adult T-cell lymphoblastic leukemia. *Leukemia* vol. 30 970–973 (2016).
28. Khanam, T., Sandmann, S., Seggewiss, J., Ruether, C., Zimmermann, M., Norvil, A. B. et al. Integrative genomic analysis of pediatric T-cell lymphoblastic lymphoma reveals candidates of clinical significance. *Blood* **137**, 2347–2359 (2021).
29. Gutierrez, A., Sanda, T., Grebluinaite, R., Carracedo, A., Salmena, L., Ahn, Y. et al. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **114**, 647–650 (2009).
30. Zuurbier, L., Petricoin, E. F., Vuerhard, M. J., Calvert, V., Kooi, C., Buijs-Gladdines, J. G. C. A. M. et al. The significance of PTEN and AKT aberrations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **97**, 1405–1413 (2012).
31. Li, Z., Song, Y., Zhang, Y., Li, C., Wang, Y., Xue, W. et al. Genomic and outcome analysis of adult T-cell lymphoblastic lymphoma. *Haematologica* vol. 105 E107–E110 (2020).
32. Fayard, E., Moncayo, G., Hemmings, B. A. & Holländer, G. A. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling in thymocytes: The need for stringent control. *Sci Signal* **3**, 1–13 (2010).
33. Chen, Y., Hou, Q., Yan, W., J. L., D. C., Z. L. et al. PIK3CA is critical for the proliferation, invasiveness, and drug resistance of human tongue carcinoma cells. *Oncol Res.* **19**, 563–571 (2011).
34. Matsuoka, T., Yashiro, M., Nishioka, N., Hirakawa, K., Olden, K. & Roberts, J. D. PI3K/Akt signalling is required for the attachment and spreading, and growth in vivo of metastatic scirrhous gastric carcinoma. *Br J Cancer* **106**, 1535–1542 (2012).
35. Li, B., Xu, W., Lam, A., Y. W., HF, H., XY, G. et al. Significance of PI3K/AKT signaling pathway in metastasis of esophageal squamous cell carcinoma and its potential as a target for anti-metastasis therapy. *Oncotarget* **8**, 38755–38766 (2017).
36. Hirsch, E., Ciruolo, E., Franco, I., Ghigo, A. & Martini, M. PI3K in cancer–stroma interactions: bad in seed and ugly in soil. *Oncogene* **2014 33:24 33**, 3083–3090 (2013).
37. Venot, Q., Blanc, T., Rabia, S. H., Berteloot, L., Ladraa, S. & Duong, J. et al. Targeted therapy in patients with PIK3CA-related overgrowth syndrome. *Nature* **558**, 540–546 (2021).
38. André, F., Ciruelos, E., Rubovszky, G., Campone, M., Loibl, S., Rugo, H. S. et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* **380**, 1929–1940 (2019).
39. Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris IV, J. P., Silverman, L. B., Sanchez-Lizarray, C. et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269–271 (2004).
40. Aref, S., el Agdar, M., Salama, O., Zeid, T. A. & Sabry, M. Significance of NOTCH1 mutations detections in T-acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer Biomark* **27**, 157–162 (2020).
41. Clappier, E., Collette, S., Grardel, N., Girard, S., Suarez, L., Brunie, G. et al. NOTCH1 and FBXW7 mutations have a favorable impact on early response to treatment, but not on outcome, in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) treated on EORTC trials 58881 and 58951. *Leukemia* **24**, 2023–2031 (2010).
42. Breit, S., Stanulla, M., Flohr, T., Schrappe, M., Ludwig, W. D., Tolle, G. et al. Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood* **108**, 1151–1157 (2006).
43. Bonn, B. R., Rohde, M., Zimmermann, M., Krieger, D., Oschlies, I., Niggli, F. et al. Incidence and prognostic relevance of genetic variations in T-cell lymphoblastic lymphoma in childhood and adolescence. *Blood* **121**, 3153–3160 (2013).
44. Lepretre, S., Touzart, A., Vermeulin, T., Picquenot, J. M., Tanguy-Schmidt, A., Salles, G. et al. Pediatric-like acute lymphoblastic leukemia therapy in adults with lymphoblastic lymphoma: the GRAALL-LYSA LL03 study. *J Clin Oncol.* **34**, 572–580 (2016).
45. Schäfer, V., Ernst, J., Rinke, J., Winkelmann, N., Beck, J. F., Hochhaus, A. et al. EZH2 mutations and promoter hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* **142**, 1641–1650 (2016).
46. Ntziachristos, P., Tsigos, A., Vlierberghe, P., Van, Nedjic, J., Trimarchi, T., Flaherty, M. S. et al. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **18**, 296–301 (2012).
47. Andrieu, G. P., Kohn, M., Simonin, M., Smith, C., Cieslak, A., Dourthe, M.-E. et al. PRC2 loss of function confers a targetable vulnerability to BET proteins in T-ALL. *Blood* **138**, 1855–1869 (2021).
48. Broux, M., Prieto, C., Demeyer, S., Bempt, M., vanden, Alberti-Servera, L., Lodewijckx, I. et al. Suz12 inactivation cooperates with JAK3 mutant signaling in the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **134**, 1323–1336 (2019).
49. Yuan, S., Wang, X., Hou, S., Guo, T., Lan, Y., Yang, S. et al. PHF6 and JAK3 mutations cooperate to drive T-cell acute lymphoblastic leukemia progression. *Leukemia* **36**, 370–382 (2022).
50. Kurzer, J. H. & Weinberg, O. K. PHF6 mutations in hematologic malignancies. *Front Oncol* **11**, 704471 (2021).
51. Liu, Y., Easton, J., Shao, Y., Maciaszek, J., Wang, Z., Wilkinson, M. R. et al. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **49**, 1211–1218 (2017).
52. Zhang, H., Wang, H., Qian, X., Gao, S., Xia, J., Liu, J. et al. Genetic mutational analysis of pediatric acute lymphoblastic leukemia from a single center in China using exon sequencing. *BMC Cancer* **20**, 211 (2020).
53. Stengel, A., Kern, W., Haferlach, T., Schnittger, S., Zenger, M. & Haferlach, C. Comparison of TP53 Alterations in Hematological Malignancies. *Blood* **126**, 4819–4819 (2015).
54. Cluzeau, T., Sebert, M., Rahmé, R., Cuzzubbo, S., Lehmann-Che, J., Madelaine, I. et al. Eprenetapopt Plus Azacitidine In TP53-mutated Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia: A Phase II Study by the Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM). *J Clin Oncol* **39**, 1575–1583 (2021).
55. Sallman, D. A., DeZern, A. E., Garcia-Manero, G., Steensma, D. P., Roboz, G. J., Sekeres, M. A. et al. Eprenetapopt (APR-246) and Azacitidine in TP53-Mutant Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* **39**, 1584–1594 (2021).
56. Li, Y., Buijs-Gladdines, J. G. C. A. M., Canté-Barrett, K., Stubbs, A. P., Vroegindeweij, E. M., Smits, W. K. et al. IL-7 Receptor Mutations and Steroid Resistance in Pediatric T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Genome Sequencing Study. *PLoS Med* **13**, e1002200 (2016).
57. Delgado-Martin, C., Meyer, L. K., Huang, B. J., Shimano, K. A., Zinter, M. S., Nguyen, J. v et al. JAK/STAT pathway inhibition overcomes IL7-induced glucocorticoid resistance in a subset of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* **2017 31:12 31**, 2568–2576 (2017).
58. Senkevitch, E., Hixon, J., Andrews, C., Barata, J. T., Li, W. & Durum, S. The JAK inhibitor ruxolitinib is effective in treating T cell acute lymphoblastic leukemia with gain of function mutations in IL-7R alpha. *Blood* **126**, 1330–1330 (2015).
59. Cabannes, A., Schmidt, A., Brissot, E., Balsat, M., Maury, S., Isnard, F. et al. The combination of Venetoclax and Tofacitinib Induced Hematological Responses in Patients with Relapse/ Refractory T-ALL with BCL2 Expression and Surface IL7R Expression or IL7R-Pathway Mutations (On Behalf of the GRAALL). *Blood* **134**, 1339 (2019).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank all participants in the GRAALL-2003 and GRAALL-2005 study groups, the SFCE and the investigators of the 16 SFCE centers involved in collection and provision of data and patient samples, and V. Lheritier for collection of clinical data. The GRAALL was supported by grants P0200701 and P030425/AOM03081 from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique, Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, France and the Swiss Federal Government in Switzerland. Samples were collected and processed by the AP-HP "Direction de Recherche Clinique" Tumor Bank at Necker-Enfants Malades. M.S. was supported by « Action Leucémie », « Soutien pour la formation à la recherche translationnelle en cancérologie, Plan cancer 2014–2019 », and the "Ligue Nationale Contre le Cancer". This work was supported by grants to Necker laboratory from the "Association Laurette Fugain", Association pour la Recherche contre le Cancer (Equipe labellisée), Institut National du Cancer PRT-K 18-071, and the Fédération Leucémie espoir and Horizon Hemato.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.B.: Data collection, methodology, analysis, validation, visualization, graphic representation, statistics, writing, original draft preparation; M.S.: Data collection, methodology, analysis, validation, visualization, graphic representation, statistics, reviewing and editing; N.G.: Reviewing and editing; L.L.: Analysis, reviewing and editing; A.T.: Reviewing and editing; G.A.: Reviewing and editing; J.B.: Reviewing and editing; E.L.: Reviewing and editing; A.P.: Reviewing and editing; N.B.: Resources, reviewing and editing; A.B.: Resources, reviewing and editing; Y.B.: Resources,

reviewing and editing T.J.M.: Resources, reviewing and editing; V.A.: Conceptualization, methodology, validation, resources, reviewing and editing, supervision, project administration.

FUNDING

The authors declare no competing financial interests or funding sources.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ETHICS APPROVAL/CONSENT TO PARTICIPATE

Diagnostic peripheral blood, bone marrow, or lymphoid tissue samples from 818 adults and children with T-LBLL (476 patients with T-ALL and 342 with T-LBL) were

centrally analyzed in Necker-Enfants Malades Hospital (AP-HP, Paris France) after informed consent was obtained at diagnosis according to the Declaration of Helsinki.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41379-022-01085-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Vahid Asnafi.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Bibliographie

- Adli, M., Zhu, J., Bernstein, B.E., 2010. Genome-wide chromatin maps derived from limited numbers of hematopoietic progenitors. *Nat Methods* 7, 615–618. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1478>
- Aiden, A.P., Rivera, M.N., Rheinbay, E., Ku, M., Coffman, E.J., Truong, T.T., Vargas, S.O., Lander, E.S., Haber, D.A., Bernstein, B.E., 2010. Wilms Tumor Chromatin Profiles Highlight Stem Cell Properties and a Renal Developmental Network. *Cell Stem Cell* 6, 591–602. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.016>
- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A.D., Araujo, I.B. de O., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A.M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J.K.C., Cheuk, W., Chng, W.-J., Choi, J.K., Chuang, S.-S., Coupland, S.E., Czader, M., Dave, S.S., de Jong, D., Du, M.-Q., Elenitoba-Johnson, K.S., Ferry, J., Geyer, J., Gratzinger, D., Guitart, J., Gujral, S., Harris, M., Harrison, C.J., Hartmann, S., Hochhaus, A., Jansen, P.M., Karube, K., Kempf, W., Khoury, J., Kimura, H., Klapper, W., Kovach, A.E., Kumar, S., Lazar, A.J., Lazzi, S., Leoncini, L., Leung, N., Leventaki, V., Li, X.-Q., Lim, M.S., Liu, W.-P., Louissaint, A., Marcogliese, A., Medeiros, L.J., Michal, M., Miranda, R.N., Mitteldorf, C., Montes-Moreno, S., Morice, W., Nardi, V., Naresh, K.N., Natkunam, Y., Ng, S.-B., Oschlies, I., Ott, G., Parrens, M., Pulitzer, M., Rajkumar, S.V., Rawstron, A.C., Rech, K., Rosenwald, A., Said, J., Sarkozy, C., Sayed, S., Saygin, C., Schuh, A., Sewell, W., Siebert, R., Sohani, A.R., Tooze, R., Traverse-Glehen, A., Vega, F., Vergier, B., Wechalekar, A.D., Wood, B., Xerri, L., Xiao, W., 2022. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 36, 1720–1748. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>
- Alexander, T.B., Lacayo, N.J., Choi, J.K., Ribeiro, R.C., Pui, C.-H., Rubnitz, J.E., 2016. Phase I Study of Selinexor, a Selective Inhibitor of Nuclear Export, in Combination With Fludarabine and Cytarabine, in Pediatric Relapsed or Refractory Acute Leukemia. *J Clin Oncol* 34, 4094–4101. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.5066>
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F., 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS* 100, 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Andrieu, G.P., Kohn, M., Simonin, M., Smith, C., Cieslak, A., Dourthe, M.-E., Charbonnier, G., Graux, C., Rigal-Huguet, F., Lheritier, V., Dombret, H., Spicuglia, S., Rousselot, P., Boissel, N., Asnafi, V., 2021. PRC2 loss of function confers a targetable vulnerability to BET proteins in T-ALL. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2020010081>
- Ang, Y.-S., Tsai, S.-Y., Lee, D.-F., Monk, J., Su, J., Ratnakumar, K., Ding, J., Ge, Y., Darr, H., Chang, B., Wang, J., Rendl, M., Bernstein, E., Schaniel, C., Lemischka, I.R., 2011. Wdr5 Mediates Self-Renewal and Reprogramming via the Embryonic Stem Cell Core Transcriptional Network. *Cell* 145, 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.003>
- Armstrong, F., de la Grange, P.B., Gerby, B., Rouyez, M.-C., Calvo, J., Fontenay, M., Boissel, N., Dombret, H., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Roméo, P.-H., Ballerini, P., Pflumio, F., 2009. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood* 113, 1730–1740. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-138172>
- Asnafi, V., Beldjord, K., Boulanger, E., Comba, B., Le Tutour, P., Estienne, M.-H., Davi, F., Landman-Parker, J., Quartier, P., Buzyn, A., Delabesse, E., Valensi, F., Macintyre, E., 2003. Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. *Blood* 101, 2693–2703. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2438>
- Asnafi, V., Buzyn, A., Le Noir, S., Baleyrier, F., Simon, A., Beldjord, K., Reman, O., Witz, F.,

Fagot, T., Tavernier, E., Turlure, P., Leguay, T., Huguet, F., Vernant, J.-P., Daniel, F., Béné, M.-C., Ifrah, N., Thomas, X., Dombret, H., Macintyre, E., 2009. NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. *Blood* 113, 3918–3924. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-184069>

Baldus, C.D., Thibaut, J., Goekbuget, N., Stroux, A., Schlee, C., Mossner, M., Burmeister, T., Schwartz, S., Bloomfield, C.D., Hoelzer, D., Thiel, E., Hofmann, W.-K., 2009. Prognostic implications of NOTCH1 and FBXW7 mutations in adult acute T-lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 94, 1383–1390. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.005272>

Bandapalli, O.R., Zimmermann, M., Kox, C., Stanulla, M., Schrappe, M., Ludwig, W.-D., Koehler, R., Muckenthaler, M.U., Kulozik, A.E., 2013. NOTCH1 activation clinically antagonizes the unfavorable effect of PTEN inactivation in BFM-treated children with precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 98, 928–936. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.073585>

Bardini, M., Woll, P.S., Corral, L., Luc, S., Wittmann, L., Ma, Z., Lo Nigro, L., Basso, G., Biondi, A., Cazzaniga, G., Jacobsen, S.E.W., 2015. Clonal variegation and dynamic competition of leukemia-initiating cells in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangement. *Leukemia* 29, 38–50. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.154>

Basso, K., Mussolin, L., Lettieri, A., Brahmachary, M., Lim, W.K., Califano, A., Basso, G., Biondi, A., Cazzaniga, G., Rosolen, A., 2011. T-cell lymphoblastic lymphoma shows differences and similarities with T-cell acute lymphoblastic leukemia by genomic and gene expression analyses. *Genes, Chromosomes and Cancer* 50, 1063–1075. <https://doi.org/10.1002/gcc.20924>

Ben Abdelali, R., Asnafi, V., Leguay, T., Boissel, N., Buzyn, A., Chevallier, P., Thomas, X., Lepretre, S., Huguet, F., Vey, N., Escoffre-Barbe, M., Tavernier, E., Reman, O., Fegueux, N., Turlure, P., Rousselot, P., Cahn, J.-Y., Lheritier, V., Chalandon, Y., Béné, M.-C., Macintyre, E., Dombret, H., Ifrah, N., Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia, 2011. Pediatric-inspired intensified therapy of adult T-ALL reveals the favorable outcome of NOTCH1/FBXW7 mutations, but not of low ERG/BAALC expression: a GRAALL study. *Blood* 118, 5099–5107. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-334219>

Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., van't Veer, M.B., 1995. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9, 1783–1786.

Berg, S.L., Blaney, S.M., Devidas, M., Lampkin, T.A., Murgo, A., Bernstein, M., Billett, A., Kurtzberg, J., Reaman, G., Gaynon, P., Whitlock, J., Krailo, M., Harris, M.B., 2016. Phase II Study of Nelarabine (compound 506U78) in Children and Young Adults With Refractory T-Cell Malignancies: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.426>

Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2005. Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse. *Cell* 120, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.001>

Bhojwani, D., Pui, C.-H., 2013. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 14, e205-217. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70580-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70580-6)

Birsén, R., Grignano, E., Chapuis, N., Bouscary, D., 2021a. Ferroptose et cancer: Implications physiopathologiques et thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 37, 726–734. <https://doi.org/10.1051/medsci/2021108>

Birsén, R., Larrue, C., Decroocq, J., Johnson, N., Guiraud, N., Gotanegre, M., Cantero-Aguilar, L., Grignano, E., Huynh, T., Fontenay, M., Kosmider, O., Mayeux, P., Chapuis, N., Sarry, J.E., Tamburini, J., Bouscary, D., 2021b. APR-246 induces early cell death by ferroptosis in acute

myeloid leukemia. *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.259531>

Boissel, N., Auclerc, M.-F., Lhéritier, V., Perel, Y., Thomas, X., Leblanc, T., Rousselot, P., Cayuela, J.-M., Gabert, J., Fegueux, N., Pigué, C., Huguet-Rigal, F., Berthou, C., Boiron, J.-M., Pautas, C., Michel, G., Fièrè, D., Leverger, G., Dombret, H., Baruchel, A., 2003. Should adolescents with acute lymphoblastic leukemia be treated as old children or young adults? Comparison of the French FRALLE-93 and LALA-94 trials. *J. Clin. Oncol.* 21, 774–780. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.053>

Boissel, N., Baruchel, A., 2018. Acute lymphoblastic leukemia in adolescent and young adults: treat as adults or as children? *Blood* 132, 351–361. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-778530>

Bond, J., Marchand, T., Touzart, A., Cieslak, A., Trinquand, A., Sutton, L., Radford-Weiss, I., Lhermitte, L., Spicuglia, S., Dombret, H., Macintyre, E., Ifrah, N., Hamel, J.-F., Asnafi, V., 2016. An early thymic precursor phenotype predicts outcome exclusively in HOXA-overexpressing adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *Haematologica* 101, 732–740. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.141218>

Bond, J., Touzart, A., Leprêtre, S., Graux, C., Bargetzi, M., Lhermitte, L., Hypolite, G., Leguay, T., Hicheri, Y., Guillermin, G., Bilger, K., Lhéritier, V., Hunault, M., Huguet, F., Chalandon, Y., Ifrah, N., Macintyre, E., Dombret, H., Asnafi, V., Boissel, N., 2019. DNMT3A mutation is associated with increased age and adverse outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 104, 1617–1625. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.197848>

Bonnet, D., Dick, J.E., 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.

Borssén, M., Haider, Z., Landfors, M., Norén-Nyström, U., Schmiegelow, K., Åsberg, A.E., Kanerva, J., Madsen, H.O., Marquart, H., Heyman, M., Hultdin, M., Roos, G., Forestier, E., Degerman, S., 2016. DNA Methylation Adds Prognostic Value to Minimal Residual Disease Status in Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 63, 1185–1192. <https://doi.org/10.1002/pbc.25958>

Bride, K.L., Vincent, T.L., Im, S.-Y., Aplenc, R., Barrett, D.M., Carroll, W.L., Carson, R., Dai, Y., Devidas, M., Dunsmore, K.P., Fuller, T., Glisovic-Aplenc, T., Horton, T.M., Hunger, S.P., Loh, M.L., Maude, S.L., Raetz, E.A., Winter, S.S., Grupp, S.A., Hermiston, M.L., Wood, B.L., Teachey, D.T., 2018. Preclinical efficacy of daratumumab in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 131, 995–999. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-794214>

Burkhardt, B., 2010. Paediatric lymphoblastic T-cell leukaemia and lymphoma: one or two diseases? *British Journal of Haematology* 149, 653–668. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08006.x>

Burkhardt, B., Moericke, A., Klapper, W., Greene, F., Salzburg, J., Damm-Welk, C., Zimmermann, M., Strauch, K., Ludwig, W.-D., Schrappe, M., Reiter, A., 2008. Pediatric precursor T lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma: Differences in the common regions with loss of heterozygosity at chromosome 6q and their prognostic impact. *Leuk Lymphoma* 49, 451–461. <https://doi.org/10.1080/10428190701824551>

Cabannes, A., Schmidt, A., Brissot, E., Balsat, M., Maury, S., Isnard, F., Chevallier, P., Cacheux, V., Cluzeau, T., Graux, C., Lhermitte, L., Dombret, H., Boissel, N., Asnafi, V., Rousselot, P., 2019. The Combination of Venetoclax and Tofacitinib Induced Hematological Responses in Patients with Relapse/ Refractory T-ALL with BCL2 Expression and Surface IL7R Expression or IL7R-Pathway Mutations (On behalf of the GRAALL). *Blood* 134, 1339–1339. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-130818>

Castor, A., Nilsson, L., Åstrand-Grundström, I., Buitenhuis, M., Ramirez, C., Anderson, K., Strömbeck, B., Garwicz, S., Békássy, A.N., Schmiegelow, K., Lausen, B., Hokland, P., Lehmann, S., Juliusson, G., Johansson, B., Jacobsen, S.E.W., 2005. Distinct patterns of

hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 11, 630–637. <https://doi.org/10.1038/nm1253>

Cavé, H., van der Werff ten Bosch, J., Suciú, S., Guidal, C., Waterkeyn, C., Otten, J., Bakkus, M., Thielemans, K., Grandchamp, B., Vilmer, E., Nelken, B., Fournier, M., Boutard, P., Lebrun, E., Méchinaud, F., Garand, R., Robert, A., Dastugue, N., Plouvier, E., Racadot, E., Ferster, A., Gyselinck, J., Fenneteau, O., Duval, M., Solbu, G., Manel, A.-M., 1998. Clinical Significance of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 339, 591–598. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808273390904>

Chen, B., Jiang, L., Zhong, M.-L., Li, J.-F., Li, B.-S., Peng, L.-J., Dai, Y.-T., Cui, B.-W., Yan, T.-Q., Zhang, W.-N., Weng, X.-Q., Xie, Y.-Y., Lu, J., Ren, R.-B., Chen, S.-N., Hu, J.-D., Wu, D.-P., Chen, Z., Tang, J.-Y., Huang, J.-Y., Mi, J.-Q., Chen, S.-J., 2018. Identification of fusion genes and characterization of transcriptome features in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 373–378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717125115>

Chen, K., Chen, Z., Wu, D., Zhang, L., Lin, X., Su, J., Rodriguez, B., Xi, Y., Xia, Z., Chen, X., Shi, X., Wang, Q., Li, W., 2015. Broad H3K4me3 is associated with increased transcription elongation and enhancer activity at tumor-suppressor genes. *Nat Genet* 47, 1149–1157. <https://doi.org/10.1038/ng.3385>

Chiu, P.P.L., Jiang, H., Dick, J.E., 2010. Leukemia-initiating cells in human T-lymphoblastic leukemia exhibit glucocorticoid resistance. *Blood* 116, 5268–5279. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-292300>

Ciofani, M., Schmitt, T.M., Ciofani, A., Michie, A.M., Çuburu, N., Aublin, A., Maryanski, J.L., Zúñiga-Pflücker, J.C., 2004. Obligatory Role for Cooperative Signaling by Pre-TCR and Notch during Thymocyte Differentiation. *The Journal of Immunology* 172, 5230–5239. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5230>

Cluzeau, T., Seberty, M., Rahmé, R., Cuzzubbo, S., Lehmann-Che, J., Madelaine, I., Peterlin, P., Bève, B., Attalah, H., Chermat, F., Miekoutima, E., Rauzy, O.B., Recher, C., Stamatoullas, A., Willems, L., Raffoux, E., Berthon, C., Quesnel, B., Loschi, M., Carpentier, A.F., Sallman, D.A., Komrokji, R., Walter-Petrich, A., Chevret, S., Ades, L., Fenaux, P., 2021. Eprenetapopt Plus Azacitidine in TP53-Mutated Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia: A Phase II Study by the Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM). *J Clin Oncol* JCO2002342. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02342>

Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., Golub, T.R., 2000. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3260–3265. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3260>

Collins, B.E., Greer, C.B., Coleman, B.C., Sweatt, J.D., 2019. Histone H3 lysine K4 methylation and its role in learning and memory. *Epigenetics & Chromatin* 12, 7. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0251-8>

Cooper, T.M., Sison, E.A.R., Baker, S.D., Li, L., Ahmed, A., Trippett, T., Gore, L., Macy, M.E., Narendran, A., August, K., Absalon, M.J., Boklan, J., Pollard, J., Magoon, D., Brown, P.A., 2017. A Phase 1 Study of the CXCR4 Antagonist Plerixafor in Combination With High-Dose Cytarabine and Etoposide in Children With Relapsed or Refractory Acute Leukemias or Myelodysplastic Syndrome: A Pediatric Oncology Experimental Therapeutics Investigators' Consortium Study (POE 10-03). *Pediatr Blood Cancer* 64, 10.1002/psc.26414. <https://doi.org/10.1002/psc.26414>

Cordo, V., van der Zwet, J.C.G., Canté-Barrett, K., Pieters, R., Meijerink, J.P.P., 2021. T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Roadmap to Targeted Therapies. *Blood Cancer Discovery* 2, 19–31. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-20-0093>

Coustan-Smith, E., Mullighan, C.G., Onciu, M., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Pei, D., Cheng, C., Su, X., Rubnitz, J.E., Basso, G., Biondi, A., Pui, C.-H., Downing, J.R., Campana, D., 2009.

Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 10, 147–156. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70314-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70314-0)

Cox, C.V., Diamanti, P., Evely, R.S., Kearns, P.R., Blair, A., 2009. Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL. *Blood* 113, 3287–3296. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-154187>

Cox, C.V., Evely, R.S., Oakhill, A., Pamphilon, D.H., Goulden, N.J., Blair, A., 2004. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* 104, 2919–2925. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0901>

Cox, C.V., Martin, H.M., Kearns, P.R., Virgo, P., Evely, R.S., Blair, A., 2007. Characterization of a progenitor cell population in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 109, 674–682. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-030445>

Dadi, S., Le Noir, S., Payet-Bornet, D., Lhermitte, L., Zacarias-Cabeza, J., Bergeron, J., Villarèse, P., Vachez, E., Dik, W.A., Millien, C., Radford, I., Verhoeyen, E., Cosset, F.-L., Petit, A., Ifrah, N., Dombret, H., Hermine, O., Spicuglia, S., Langerak, A.W., Macintyre, E.A., Nadel, B., Ferrier, P., Asnafi, V., 2012. TLX homeodomain oncogenes mediate T cell maturation arrest in T-ALL via interaction with ETS1 and suppression of TCR α gene expression. *Cancer Cell* 21, 563–576. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.013>

Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., Li, F., 2006. The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology*, 25 years of the c-Myc oncogene 16, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.014>

Daver, N., Bumber, Y., Kantarjian, H., Ravandi, F., Cortes, J., Rytting, M.E., Kawedia, J.D., Basnett, J., Culotta, K.S., Zeng, Z., Lu, H., Richie, M.A., Garris, R., Xiao, L., Liu, W., Baggerly, K.A., Jabbour, E., O'Brien, S., Burger, J., Bendall, L.J., Thomas, D., Konopleva, M., 2015. A Phase I/II Study of the mTOR Inhibitor Everolimus in Combination with HyperCVAD Chemotherapy in Patients with Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res* 21, 2704–2714. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2888>

De Moerloose, B., Suci, S., Ferster, A., Mazingue, F., Sirvent, N., Costa, V., Yakouben, K., Lutz, P., Uyttebroeck, A., Plantaz, D., Plat, G., Millot, F., Rohrlich, P., Poiree, M., Van der Werff Ten Bosch, J., Hoyoux, C., Boutard, P., Cavé, H., Girard, S., Sirvent, F.B., Benoit, Y., Bertrand, Y., 2012. Low CNS Relapse Incidence without Radiotherapy and Improvement of Outcome: Results of Subsequent EORTC-CLG 58881 and 58951 Trials in Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Blood* 120, 133. <https://doi.org/10.1182/blood.V120.21.133.133>

De Smedt, R., Morscio, J., Goossens, S., Van Vlierberghe, P., 2019. Targeting steroid resistance in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Reviews* 38, 100591. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100591>

De Smedt, R., Morscio, J., Reunes, L., Roels, J., Bardelli, V., Lintermans, B., Van Loocke, W., Almeida, A., Cheung, L.C., Kotecha, R.S., Mansour, M.R., Uyttebroeck, A., Vandenberghe, P., La Starza, R., Mecucci, C., Lammens, T., Van Roy, N., De Moerloose, B., Barata, J.T., Taghon, T., Goossens, S., Van Vlierberghe, P., 2020. Targeting cytokine- and therapy-induced PIM1 activation in preclinical models of T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Blood* 135, 1685–1695. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003880>

Deenik, W., Beverloo, H.B., van der Poel-van de Luytgaarde, S.C.P. a. M., Wattel, M.M., van Esser, J.W.J., Valk, P.J.M., Cornelissen, J.J., 2009. Rapid complete cytogenetic remission after upfront dasatinib monotherapy in a patient with a NUP214-ABL1-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 23, 627–629. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.318>

Degryse, S., de Bock, C.E., Demeyer, S., Govaerts, I., Bornschein, S., Verbeke, D., Jacobs, K., Binos, S., Skerrett-Byrne, D.A., Murray, H.C., Verrills, N.M., Van Vlierberghe, P., Cools, J., Dun, M.D., 2018. Mutant JAK3 phosphoproteomic profiling predicts synergism between JAK3 inhibitors and MEK/BCL2 inhibitors for the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia.

Leukemia 32, 788–800. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.276>

Demir, S., Boldrin, E., Sun, Q., Hampp, S., Tausch, E., Eckert, C., Ebinger, M., Handgretinger, R., Kronnie, G.T., Wiesmüller, L., Stilgenbauer, S., Selivanova, G., Debatin, K.-M., Meyer, L.H., 2020. Therapeutic targeting of mutant p53 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 105, 170–181. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.199364>

Domenech, C., Suci, S., De Moerloose, B., Mazingue, F., Plat, G., Ferster, A., Uyttebroeck, A., Sirvent, N., Lutz, P., Yakouben, K., Munzer, M., Röhrlich, P., Plantaz, D., Millot, F., Philippet, P., Dastugue, N., Girard, S., Cavé, H., Benoit, Y., Bertrandfor, Y., 2014. Dexamethasone (6 mg/m²/day) and prednisolone (60 mg/m²/day) were equally effective as induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia in the EORTC CLG 58951 randomized trial. *Haematologica* 99, 1220–1227. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.103507>

Dunsmore, K.P., Winter, S.S., Devidas, M., Wood, B.L., Esiashvili, N., Chen, Z., Eisenberg, N., Briegel, N., Hayashi, R.J., Gastier-Foster, J.M., Carroll, A.J., Heerema, N.A., Asselin, B.L., Rabin, K.R., Zweidler-Mckay, P.A., Raetz, E.A., Loh, M.L., Schultz, K.R., Winick, N.J., Carroll, W.L., Hunger, S.P., 2020. Children's Oncology Group AALL0434: A Phase III Randomized Clinical Trial Testing Nelarabine in Newly Diagnosed T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO* 38, 3282–3293. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00256>

Ebinger, S., Özdemir, E.Z., Ziegenhain, C., Tiedt, S., Castro Alves, C., Grunert, M., Dworzak, M., Lutz, C., Turati, V.A., Enver, T., Horny, H.-P., Sotlar, K., Parekh, S., Spiekermann, K., Hiddemann, W., Schepers, A., Polzer, B., Kirsch, S., Hoffmann, M., Knapp, B., Hasenauer, J., Pfeifer, H., Panzer-Grümayer, R., Enard, W., Gires, O., Jeremias, I., 2016. Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 30, 849–862. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.002>

Eckert, C., Parker, C., Moorman, A.V., Irving, J.A., Kirschner-Schwabe, R., Groeneveld-Krentz, S., Révész, T., Hoogerbrugge, P., Hancock, J., Sutton, R., Henze, G., Chen-Santel, C., Attarbaschi, A., Bourquin, J.-P., Sramkova, L., Zimmermann, M., Krishnan, S., von Stackelberg, A., Saha, V., 2021. Risk factors and outcomes in children with high-risk B-cell precursor and T-cell relapsed acute lymphoblastic leukaemia: combined analysis of ALLR3 and ALL-REZ BFM 2002 clinical trials. *Eur J Cancer* 151, 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.03.034>

Einsiedel, H.G., von Stackelberg, A., Hartmann, R., Fengler, R., Schrappe, M., Janka-Schaub, G., Mann, G., Hählen, K., Göbel, U., Klingebiel, T., Ludwig, W.-D., Henze, G., 2005. Long-Term Outcome in Children With Relapsed ALL by Risk-Stratified Salvage Therapy: Results of Trial Acute Lymphoblastic Leukemia-Relapse Study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. *JCO* 23, 7942–7950. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.1031>

Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., Sklar, J., 1991. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649–661. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90111-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90111-b)

Fagioli, F., Quarello, P., Zecca, M., Lanino, E., Rognoni, C., Balduzzi, A., Messina, C., Favre, C., Foà, R., Ripaldi, M., Rutella, S., Basso, G., Prete, A., Locatelli, F., 2013. Hematopoietic stem cell transplantation for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: a report from the AIEOP registry. *Haematologica* 98, 1273–1281. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.079707>

Farber, S., Diamond, L.K., 1948. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N. Engl. J. Med.* 238, 787–793. <https://doi.org/10.1056/NEJM194806032382301>

Ferrando, A.A., Neubergh, D.S., Staunton, J., Loh, M.L., Huard, C., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Pui, C.H., Downing, J.R., Gilliland, D.G., Lander, E.S., Golub, T.R., Look, A.T., 2002. Gene

expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1, 75–87.

Filippakopoulos, P., Knapp, S., 2014. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat Rev Drug Discov* 13, 337–356. <https://doi.org/10.1038/nrd4286>

Friedmann Angeli, J.P., Krysko, D.V., Conrad, M., 2019. Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion. *Nat Rev Cancer* 19, 405–414. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0149-1>

Frismantas, V., Dobay, M.P., Rinaldi, A., Tchinda, J., Dunn, S.H., Kunz, J., Richter-Pechanska, P., Marovca, B., Pail, O., Jenni, S., Diaz-Flores, E., Chang, B.H., Brown, T.J., Collins, R.H., Uhrig, S., Balasubramanian, G.P., Bandapalli, O.R., Higi, S., Eugster, S., Voegeli, P., Delorenzi, M., Cario, G., Loh, M.L., Schrappe, M., Stanulla, M., Kulozik, A.E., Muckenthaler, M.U., Saha, V., Irving, J.A., Meisel, R., Radimerski, T., Von Stackelberg, A., Eckert, C., Tyner, J.W., Horvath, P., Bornhauser, B.C., Bourquin, J.-P., 2017. Ex vivo drug response profiling detects recurrent sensitivity patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 129, e26–e37. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-738070>

García-Peydró, M., Fuentes, P., Mosquera, M., García-León, M.J., Alcain, J., Rodríguez, A., García de Miguel, P., Menéndez, P., Weijer, K., Spits, H., Scadden, D.T., Cuesta-Mateos, C., Muñoz-Calleja, C., Sánchez-Madrid, F., Toribio, M.L., 2018. The NOTCH1/CD44 axis drives pathogenesis in a T cell acute lymphoblastic leukemia model. *J. Clin. Invest.* 128, 2802–2818. <https://doi.org/10.1172/JCI92981>

Geimer Le Lay, A.-S., Oravec, A., Mastio, J., Jung, C., Marchal, P., Ebel, C., Dembélé, D., Jost, B., Le Gras, S., Thibault, C., Borggrefe, T., Kastner, P., Chan, S., 2014. The tumor suppressor Ikaros shapes the repertoire of notch target genes in T cells. *Sci Signal* 7, ra28. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004545>

Gerby, B., Clappier, E., Armstrong, F., Deswarte, C., Calvo, J., Poglio, S., Soulier, J., Boissel, N., Leblanc, T., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Roméo, P.H., Ballerini, P., Pflumio, F., 2011. Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations. *Leukemia* 25, 1249–1258. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.93>

Gerby, B., Tremblay, C.S., Tremblay, M., Rojas-Sutterlin, S., Herblot, S., Hébert, J., Sauvageau, G., Lemieux, S., Lécuyer, E., Veiga, D.F.T., Hoang, T., 2014. SCL, LMO1 and Notch1 Reprogram Thymocytes into Self-Renewing Cells. *PLOS Genetics* 10, e1004768. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004768>

Gianfelici, V., Chiaretti, S., Demeyer, S., Di Giacomo, F., Messina, M., La Starza, R., Peragine, N., Paoloni, F., Geerdens, E., Pierini, V., Elia, L., Mancini, M., De Propriis, M.S., Apicella, V., Gaidano, G., Testi, A.M., Vitale, A., Vignetti, M., Mecucci, C., Guarini, A., Cools, J., Foà, R., 2016. RNA sequencing unravels the genetics of refractory/relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. Prognostic and therapeutic implications. *Haematologica* 101, 941–950. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.139410>

Gocho, Y., Liu, J., Hu, J., Yang, Wentao, Dharia, N.V., Zhang, Jingliao, Shi, H., Du, G., John, A., Lin, T.-N., Hunt, J., Huang, X., Ju, B., Rowland, L., Shi, L., Maxwell, D., Smart, B., Crews, K.R., Yang, Wenjian, Hagiwara, K., Zhang, Y., Roberts, K., Wang, H., Jabbour, E., Stock, W., Eisfelder, B., Paietta, E., Newman, S., Roti, G., Litzow, M., Easton, J., Zhang, Jinghui, Peng, J., Chi, H., Pounds, S., Relling, M.V., Inaba, H., Zhu, X., Kornblau, S., Pui, C.-H., Konopleva, M., Teachey, D., Mullighan, C.G., Stegmaier, K., Evans, W.E., Yu, J., Yang, J.J., 2021. Network-based systems pharmacology reveals heterogeneity in LCK and BCL2 signaling and therapeutic sensitivity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Cancer* 2, 284–299. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-00167-4>

González-García, S., García-Peydró, M., Martín-Gayo, E., Ballestar, E., Esteller, M., Bornstein, R., de la Pompa, J.L., Ferrando, A.A., Toribio, M.L., 2009. CSL–MAML-dependent Notch1

signaling controls T lineage-specific IL-7R α gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 206, 779–791. <https://doi.org/10.1084/jem.20081922>

Göthert, J.R., Brake, R.L., Smeets, M., Dührsen, U., Begley, C.G., Izon, D.J., 2007. NOTCH1 pathway activation is an early hallmark of SCL T leukemogenesis. *Blood* 110, 3753–3762. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-063644>

Goyama, S., Kitamura, T., 2017. Epigenetics in normal and malignant hematopoiesis: An overview and update 2017. *Cancer Science* 108, 553–562. <https://doi.org/10.1111/cas.13168>

Grabher, C., von Boehmer, H., Look, A.T., 2006. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 6, 347–359. <https://doi.org/10.1038/nrc1880>

Greenblatt, D.Y., Cayo, M.A., Adler, J.T., Ning, L., Haymart, M.R., Kunnimalaiyaan, M., Chen, H., 2008. Valproic Acid Activates Notch1 Signaling and Induces Apoptosis in Medullary Thyroid Cancer Cells. *Ann Surg* 247, 1036–1040. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181758d0e>

Greer, E.L., Maures, T.J., Hauswirth, A.G., Green, E.M., Leeman, D.S., Maro, G.S., Han, S., Banko, M.R., Gozani, O., Brunet, A., 2010. Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature* 466, 383–387. <https://doi.org/10.1038/nature09195>

Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2007. A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell* 130, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.042>

Guo, Q.M., Malek, R.L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N.H., Dang, C.V., Liu, E.T., 2000. Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res* 60, 5922–5928.

Gutierrez, A., Sanda, T., Grebliunaite, R., Carracedo, A., Salmena, L., Ahn, Y., Dahlberg, S., Neuberg, D., Moreau, L.A., Winter, S.S., Larson, R., Zhang, J., Protopopov, A., Chin, L., Pandolfi, P.P., Silverman, L.B., Hunger, S.P., Sallan, S.E., Look, A.T., 2009. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 114, 647–650. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206722>

Habets, R.A., de Bock, C.E., Serneels, L., Lodewijckx, I., Verbeke, D., Nittner, D., Narlawar, R., Demeyer, S., Dooley, J., Liston, A., Taghon, T., Cools, J., de Strooper, B., 2019. Safe targeting of T cell acute lymphoblastic leukemia by pathology-specific NOTCH inhibition. *Science Translational Medicine* 11, eaau6246. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau6246>

Hagedorn, N., Acquaviva, C., Fronkova, E., von Stackelberg, A., Barth, A., zur Stadt, U., Schrauder, A., Trka, J., Gaspar, N., Seeger, K., Henze, G., Cavé, H., Eckert, C., 2007. Submicroscopic bone marrow involvement in isolated extramedullary relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: a more precise definition of “isolated” and its possible clinical implications, a collaborative study of the Resistant Disease Committee of the International BFM study group. *Blood* 110, 4022–4029. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-082040>

Harrington, C.T., Sotillo, E., Robert, A., Hayer, K.E., Bogusz, A.M., Psathas, J., Yu, D., Taylor, D., Dang, C.V., Klein, P., Hogarty, M.D., Geoerger, B., El-Deiry, W.S., Wiels, J., Thomas-Tikhonenko, A., 2019. Transient stabilization, rather than inhibition, of MYC amplifies extrinsic apoptosis and therapeutic responses in refractory B-cell lymphoma. *Leukemia* 33, 2429–2441. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0454-4>

Hastings, C., Gaynon, P.S., Nachman, J.B., Sather, H.N., Lu, X., Devidas, M., Seibel, N.L., 2015. Increased post-induction intensification improves outcome in children and adolescents with a markedly elevated white blood cell count ($\geq 200 \times 10^9/l$) with T cell acute lymphoblastic leukaemia but not B cell disease: a report from the Children’s Oncology Group. *British Journal of Haematology* 168, 533–546. <https://doi.org/10.1111/bjh.13160>

Hayashi, R.J., Winter, S.S., Dunsmore, K.P., Devidas, M., Chen, Z., Wood, B.L., Hermiston, M.L., Teachey, D.T., Perkins, S.L., Miles, R.R., Raetz, E.A., Loh, M.L., Winick, N.J., Carroll, W.L., Hunger, S.P., Lim, M.S., Gross, T.G., Bollard, C.M., 2020. Successful Outcomes of Newly Diagnosed T Lymphoblastic Lymphoma: Results From Children's Oncology Group AALL0434. *J Clin Oncol* 38, 3062–3070. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00531>

Heikamp, E.B., Pui, C.-H., 2018. Next-Generation Evaluation and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Pediatr.* 203, 14–24.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.07.039>

Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., Mills, G.B., 2005. Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4, 988–1004. <https://doi.org/10.1038/nrd1902>

Henze, G., Langermann, H.J., Brämsswig, J., Breu, H., Gadner, H., Schellong, G., Welte, K., Riehm, H., 1981. [The BFM 76/79 acute lymphoblastic leukemia therapy study (author's transl)]. *Klin Padiatr* 193, 145–154. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1034450>

Herranz, D., Ambesi-Impiombato, A., Palomero, T., Schnell, S.A., Belver, L., Wendorff, A.A., Xu, L., Castillo-Martin, M., Llobet-Navás, D., Cordon-Cardo, C., Clappier, E., Soulier, J., Ferrando, A.A., 2014. A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* 20, 1130–1137. <https://doi.org/10.1038/nm.3665>

Herranz, D., Ambesi-Impiombato, A., Sudderth, J., Sánchez-Martín, M., Belver, L., Tosello, V., Xu, L., Wendorff, A.A., Castillo, M., Haydu, J.E., Márquez, J., Matés, J.M., Kung, A.L., Rayport, S., Cordon-Cardo, C., DeBerardinis, R.J., Ferrando, A.A., 2015. Metabolic reprogramming induces resistance to anti-NOTCH1 therapies in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* 21, 1182–1189. <https://doi.org/10.1038/nm.3955>

Herranz, D., Ferrando, A.A., 2015. An oncogenic enhancer enemy (N-Me) in T-ALL. *Cell Cycle* 14, 167–168. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.989129>

Hödl, M., Basler, K., 2012. Transcription in the absence of histone H3.2 and H3K4 methylation. *Curr Biol* 22, 2253–2257. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.008>

Hoelzer, D., Thiel, E., Loffler, H., Bodenstein, H., Plaumann, L., Buchner, T., Urbanitz, D., Koch, P., Heimpel, H., Engelhardt, R., 1984. Intensified therapy in acute lymphoblastic and acute undifferentiated leukemia in adults. *Blood* 64, 38–47. <https://doi.org/10.1182/blood.V64.1.38.38>

Hof, J., Krentz, S., van Schewick, C., Körner, G., Shalapour, S., Rhein, P., Karawajew, L., Ludwig, W.-D., Seeger, K., Henze, G., von Stackelberg, A., Hagemeyer, C., Eckert, C., Kirschner-Schwabe, R., 2011. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 29, 3185–3193. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.8144>

Hogan, L.E., Bhatla, T., Teachey, D.T., Sirvent, F.J.B., Moppett, J., Puyó, P.V., Micalizzi, C., R?Ssig, C., Shukla, N., Gilad, G., Locatelli, F., Baruchel, A., Zwaan, C.M., Raetz, E.A., Bandyopadhyay, N., Solano, L.L., Dennis, R.M., Carson, R.L., Vora, A., 2022. Efficacy and safety of daratumumab (DARA) in pediatric and young adult patients (pts) with relapsed/refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) or lymphoblastic lymphoma (LL): Results from the phase 2 DELPHINUS study. *Journal of Clinical Oncology*. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.10001

Horton, T.M., Whitlock, J.A., Lu, X., O'Brien, M.M., Borowitz, M.J., Devidas, M., Raetz, E.A., Brown, P.A., Carroll, W.L., Hunger, S.P., 2019. Bortezomib reinduction chemotherapy in high-risk ALL in first relapse: a report from the Children's Oncology Group. *British Journal of Haematology* 186, 274–285. <https://doi.org/10.1111/bjh.15919>

Hoxhaj, G., Manning, B.D., 2020. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 20, 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41568->

019-0216-7

- Hsiao, M.H., Yu, A.L., Yeargin, J., Ku, D., Haas, M., 1994. Nonhereditary p53 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia are associated with the relapse phase. *Blood* 83, 2922–2930.
- Huguet, F., Chevret, S., Leguay, T., Thomas, X., Boissel, N., Escoffre-Barbe, M., Chevallier, P., Hunault, M., Vey, N., Bonmati, C., Lepretre, S., Marolleau, J.-P., Pabst, T., Rousselot, P., Buzyn, A., Cahn, J.-Y., Lhéritier, V., Béné, M.C., Asnafi, V., Delabesse, E., Macintyre, E., Chalandon, Y., Ifrah, N., Dombret, H., Group of Research on Adult ALL (GRAALL), 2018. Intensified Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Report of the Randomized GRAALL-2005 Clinical Trial. *J. Clin. Oncol.* 36, 2514–2523. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.8192>
- Hunger, S.P., Mullighan, C.G., 2015. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine* 373, 1541–1552. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1400972>
- Hunger, S.P., Raetz, E.A., 2020. How I treat relapsed acute lymphoblastic leukemia in the pediatric population. *Blood* 136, 1803–1812. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004043>
- Iacobucci, I., Mullighan, C.G., 2017. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 35, 975–983. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.7836>
- Irving, J., Matheson, E., Minto, L., Blair, H., Case, M., Halsey, C., Swidenbank, I., Ponthan, F., Kirschner-Schwabe, R., Groeneveld-Krentz, S., Hof, J., Allan, J., Harrison, C., Vormoor, J., von Stackelberg, A., Eckert, C., 2014. Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. *Blood* 124, 3420–3430. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-531871>
- Jeha, S., Pei, D., Choi, J., Cheng, C., Sandlund, J.T., Coustan-Smith, E., Campana, D., Inaba, H., Rubnitz, J.E., Ribeiro, R.C., Gruber, T.A., Raimondi, S.C., Khan, R.B., Yang, J.J., Mullighan, C.G., Downing, J.R., Evans, W.E., Relling, M.V., Pui, C.-H., 2019. Improved CNS Control of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Cranial Irradiation: St Jude Total Therapy Study 16. *JCO* 37, 3377–3391. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01692>
- Jeha, S., Pui, C.-H., 2009. Risk-adapted Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America, Recent Progress in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia* 23, 973–990. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.009>
- Jenkinson, S., Koo, K., Mansour, M.R., Goulden, N., Vora, A., Mitchell, C., Wade, R., Richards, S., Hancock, J., Moorman, A.V., Linch, D.C., Gale, R.E., 2013. Impact of NOTCH1/FBXW7 mutations on outcome in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia patients treated on the MRC UKALL 2003 trial. *Leukemia* 27, 41–47. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.176>
- Jotta, P.Y., Ganazza, M.A., Silva, A., Viana, M.B., da Silva, M.J., Zambaldi, L.J.G., Barata, J.T., Brandalise, S.R., Yunes, J.A., 2010. Negative prognostic impact of PTEN mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 24, 239–242. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.209>
- Kelly, P.N., Dakic, A., Adams, J.M., Nutt, S.L., Strasser, A., 2007. Tumor Growth Need Not Be Driven by Rare Cancer Stem Cells. *Science* 317, 337–337. <https://doi.org/10.1126/science.1142596>
- Kim, R., Boissel, N., Touzart, A., Leguay, T., Thonier, F., Thomas, X., Raffoux, E., Huguet, F., Villarese, P., Fourrage, C., Passini, L., Hunault, M., Lepretre, S., Chevallier, P., Braun, T., Lhéritier, V., Chantepie, S., Maury, S., Escoffre, M., Tavernier, E., Chalandon, Y., Graux, C., Macintyre, E., Ifrah, N., Asnafi, V., Dombret, H., Lhermitte, L., on behalf the GRAALL group, 2020. Adult T-cell acute lymphoblastic leukemias with IL7R pathway mutations are slow-responders who do not benefit from allogeneic stem-cell transplantation. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0685-4>
- Kong, J., Chen, N., Li, M., Zhang, J., Wu, X., Zong, L., Wu, D., Song, B., Qiu, H., 2022. Venetoclax and decitabine in refractory TP53-mutated early T-cell precursor acute

lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 101, 697–699. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04530-y>

Kong, Y., Yoshida, S., Saito, Y., Doi, T., Nagatoshi, Y., Fukata, M., Saito, N., Yang, S.M., Iwamoto, C., Okamura, J., Liu, K.Y., Huang, X.J., Lu, D.P., Shultz, L.D., Harada, M., Ishikawa, F., 2008. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38–CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia* 22, 1207–1213. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.83>

Kox, C., Zimmermann, M., Stanulla, M., Leible, S., Schrappe, M., Ludwig, W.-D., Koehler, R., Tolle, G., Bandapalli, O.R., Breit, S., Muckenthaler, M.U., Kulozik, A.E., 2010. The favorable effect of activating NOTCH1 receptor mutations on long-term outcome in T-ALL patients treated on the ALL–BFM 2000 protocol can be separated from FBXW7 loss of function. *Leukemia* 24, 2005–2013. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.203>

Kreso, A., Dick, J.E., 2014. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 14, 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>

Kress, T.R., Sabò, A., Amati, B., 2015. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. *Nat Rev Cancer* 15, 593–607. <https://doi.org/10.1038/nrc3984>

Kroeze, E., Loeffen, J.L.C., Poort, V.M., Meijerink, J.P.P., 2020. T-cell lymphoblastic lymphoma and leukemia: different diseases from a common premalignant progenitor? *Blood Advances* 4, 3466–3473. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001822>

Kunz, J.B., Rausch, T., Bandapalli, O.R., Eilers, J., Pechanska, P., Schuessel, S., Assenov, Y., Stütz, A.M., Kirschner-Schwabe, R., Hof, J., Eckert, C., von Stackelberg, A., Schrappe, M., Stanulla, M., Koehler, R., Avigad, S., Elitzur, S., Handgretinger, R., Benes, V., Weischenfeldt, J., Korbel, J.O., Muckenthaler, M.U., Kulozik, A.E., 2015. Pediatric T-cell lymphoblastic leukemia evolves into relapse by clonal selection, acquisition of mutations and promoter hypomethylation. *Haematologica* 100, 1442–1450. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.129692>

La Starza, R., Cambò, B., Pierini, A., Bornhauser, B., Montanaro, A., Bourquin, J.-P., Mecucci, C., Roti, G., 2019. Venetoclax and Bortezomib in Relapsed/Refractory Early T-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO Precision Oncology* 1–6. <https://doi.org/10.1200/PO.19.00172>

Lambert, J.M.R., Gorzov, P., Veprintsev, D.B., Söderqvist, M., Segerbäck, D., Bergman, J., Fersht, A.R., Hainaut, P., Wiman, K.G., Bykov, V.J.N., 2009. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* 15, 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.003>

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., Dick, J.E., 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>

Larsen, E.C., Devidas, M., Chen, S., Salzer, W.L., Raetz, E.A., Loh, M.L., Mattano, L.A., Cole, C., Eicher, A., Haugan, M., Sorenson, M., Heerema, N.A., Carroll, A.A., Gastier-Foster, J.M., Borowitz, M.J., Wood, B.L., Willman, C.L., Winick, N.J., Hunger, S.P., Carroll, W.L., 2016. Dexamethasone and High-Dose Methotrexate Improve Outcome for Children and Young Adults With High-Risk B-Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From Children’s Oncology Group Study AALL0232. *J Clin Oncol* 34, 2380–2388. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.4544>

Larson, R., Dodge, R., Burns, C., Lee, E., Stone, R., Schulman, P., Duggan, D., Davey, F., Sobol, R., Frankel, S., 1995. A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811. *Blood* 85, 2025–2037. <https://doi.org/10.1182/blood.V85.8.2025.bloodjournal8582025>

le Viseur, C., Hotfilder, M., Bomken, S., Wilson, K., Röttgers, S., Schrauder, A., Rosemann, A., Irving, J., Stam, R.W., Shultz, L.D., Harbott, J., Jürgens, H., Schrappe, M., Pieters, R.,

Vormoor, J., 2008. In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Blasts at Different Stages of Immunophenotypic Maturation Have Stem Cell Properties. *Cancer Cell* 14, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.015>

Lee, L.A., Dang, C.V., 2006. Myc target transcriptomes. *Curr Top Microbiol Immunol* 302, 145–167. https://doi.org/10.1007/3-540-32952-8_6

Lei, G., Zhuang, L., Gan, B., 2022. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer. *Nat Rev Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00459-0>

Lepretre, S., Touzart, A., Vermeulin, T., Picquenot, J.-M., Tanguy-Schmidt, A., Salles, G., Lamy, T., Béné, M.-C., Raffoux, E., Hugué, F., Chevallier, P., Bologna, S., Bouabdallah, R., Benichou, J., Brière, J., Moreau, A., Tallon-Simon, V., Seris, S., Graux, C., Asnafi, V., Ifrah, N., Macintyre, E., Dombret, H., 2016. Pediatric-Like Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy in Adults With Lymphoblastic Lymphoma: The GRAALL-LYSA LL03 Study. *Journal of Clinical Oncology* 34, 572–580. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.5385>

Li, B., Brady, S.W., Ma, X., Shen, S., Zhang, Y., Li, Y., Szlachta, K., Dong, L., Liu, Yu, Yang, F., Wang, N., Flasch, D.A., Myers, M.A., Mulder, H.L., Ding, L., Liu, Yanling, Tian, L., Hagiwara, K., Xu, K., Zhou, X., Sioson, E., Wang, T., Yang, L., Zhao, J., Zhang, H., Shao, Y., Sun, H., Sun, L., Cai, J., Sun, H.-Y., Lin, T.-N., Du, L., Li, H., Rusch, M., Edmonson, M.N., Easton, J., Zhu, X., Zhang, Jingliao, Cheng, C., Raphael, B.J., Tang, J., Downing, J.R., Alexandrov, L.B., Zhou, B.-B.S., Pui, C.-H., Yang, J.J., Zhang, Jinghui, 2020. Therapy-induced mutations drive the genomic landscape of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 135, 41–55. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002220>

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., Simeone, D.M., 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67, 1030–1037. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2030>

Liu, D.S., Duong, C.P., Haupt, S., Montgomery, K.G., House, C.M., Azar, W.J., Pearson, H.B., Fisher, O.M., Read, M., Guerra, G.R., Haupt, Y., Cullinane, C., Wiman, K.G., Abrahmsen, L., Phillips, W.A., Clemons, N.J., 2017. Inhibiting the system xC⁻/glutathione axis selectively targets cancers with mutant-p53 accumulation. *Nat Commun* 8, 14844. <https://doi.org/10.1038/ncomms14844>

Liu, R.-B., Guo, J.-G., Liu, T.-Z., Guo, C.-C., Fan, X.-X., Zhang, X., Hu, W.-H., Cai, X.-Y., 2017. Meta-analysis of the clinical characteristics and prognostic relevance of NOTCH1 and FBXW7 mutation in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* 8, 66360–66370. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18576>

Liu, Y., Easton, J., Shao, Y., Maciaszek, J., Wang, Z., Wilkinson, M.R., McCastlain, K., Edmonson, M., Pounds, S.B., Shi, L., Zhou, X., Ma, X., Sioson, E., Li, Y., Rusch, M., Gupta, P., Pei, D., Cheng, C., Smith, M.A., Auvil, J.G., Gerhard, D.S., Relling, M.V., Winick, N.J., Carroll, A.J., Heerema, N.A., Raetz, E., Devidas, M., Willman, C.L., Harvey, R.C., Carroll, W.L., Dunsmore, K.P., Winter, S.S., Wood, B.L., Sorrentino, B.P., Downing, J.R., Loh, M.L., Hunger, S.P., Zhang, J., Mullighan, C.G., 2017. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics* 49, 1211–1218. <https://doi.org/10.1038/ng.3909>

Lonetti, A., Antunes, I.L., Chiarini, F., Orsini, E., Buontempo, F., Ricci, F., Tazzari, P.L., Pagliaro, P., Melchionda, F., Pession, A., Bertaina, A., Locatelli, F., McCubrey, J.A., Barata, J.T., Martelli, A.M., 2014. Activity of the pan-class I phosphoinositide 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 28, 1196–1206. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.369>

Lonetti, A., Cappellini, A., Bertaina, A., Locatelli, F., Pession, A., Buontempo, F., Evangelisti, Camilla, Evangelisti, Cecilia, Orsini, E., Zambonin, L., Neri, L.M., Martelli, A.M., Chiarini, F., 2016. Improving nelarabine efficacy in T cell acute lymphoblastic leukemia by targeting aberrant PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *J Hematol Oncol* 9, 114.

<https://doi.org/10.1186/s13045-016-0344-4>

Mansour, M.R., Sulis, M.L., Duke, V., Foroni, L., Jenkinson, S., Koo, K., Allen, C.G., Gale, R.E., Buck, G., Richards, S., Paietta, E., Rowe, J.M., Tallman, M.S., Goldstone, A.H., Ferrando, A.A., Linch, D.C., 2009. Prognostic implications of NOTCH1 and FBXW7 mutations in adults with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated on the MRC UKALLXII/ECOG E2993 protocol. *J Clin Oncol* 27, 4352–4356. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.0996>

Margolin, A.A., Palomero, T., Sumazin, P., Califano, A., Ferrando, A.A., Stolovitzky, G., 2009. ChIP-on-chip significance analysis reveals large-scale binding and regulation by human transcription factor oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 244–249. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806445106>

Marks, D.I., Paietta, E.M., Moorman, A.V., Richards, S.M., Buck, G., DeWald, G., Ferrando, A., Fielding, A.K., Goldstone, A.H., Ketterling, R.P., Litzow, M.R., Luger, S.M., McMillan, A.K., Mansour, M.R., Rowe, J.M., Tallman, M.S., Lazarus, H.M., 2009. T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood* 114, 5136–5145. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-231217>

Maude, S.L., Dolai, S., Delgado-Martin, C., Vincent, T., Robbins, A., Selvanathan, A., Ryan, T., Hall, J., Wood, A.C., Tasian, S.K., Hunger, S.P., Loh, M.L., Mullighan, C.G., Wood, B.L., Hermiston, M.L., Grupp, S.A., Lock, R.B., Teachey, D.T., 2015. Efficacy of JAK/STAT pathway inhibition in murine xenograft models of early T-cell precursor (ETP) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 125, 1759–1767. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-580480>

Medyouf, H., Gusscott, S., Wang, H., Tseng, J.-C., Wai, C., Nemirovsky, O., Trumpp, A., Pflumio, F., Carboni, J., Gottardis, M., Pollak, M., Kung, A.L., Aster, J.C., Holzenberger, M., Weng, A.P., 2011. High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *Journal of Experimental Medicine* 208, 1809–1822. <https://doi.org/10.1084/jem.20110121>

Meyer, J.A., Wang, J., Hogan, L.E., Yang, J.J., Dandekar, S., Patel, J.P., Tang, Z., Zumbo, P., Li, S., Zavadil, J., Levine, R.L., Cardozo, T., Hunger, S.P., Raetz, E.A., Evans, W.E., Morrison, D.J., Mason, C.E., Carroll, W.L., 2013. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 45, 290–294. <https://doi.org/10.1038/ng.2558>

Mitchell, C.D., Richards, S.M., Kinsey, S.E., Lilleyman, J., Vora, A., Eden, T.O.B., Medical Research Council Childhood Leukaemia Working Party, 2005. Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the UK Medical Research Council ALL97 randomized trial. *Br J Haematol* 129, 734–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05509.x>

Moorman, A.V., 2016. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 101, 407–416. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.141101>

Morgan, T.H., 1917. The Theory of the Gene. *The American Naturalist* 51, 513–544.

Möricke, A., Reiter, A., Zimmermann, M., Gadner, H., Stanulla, M., Dördelmann, M., Löning, L., Beier, R., Ludwig, W.-D., Ratei, R., Harbott, J., Boos, J., Mann, G., Niggli, F., Feldges, A., Henze, G., Welte, K., Beck, J.-D., Klingebiel, T., Niemeyer, C., Zintl, F., Bode, U., Urban, C., Wehinger, H., Niethammer, D., Riehm, H., Schrappe, M., for the German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group, 2008. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 111, 4477–4489. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-112920>

Möricke, A., Zimmermann, M., Valsecchi, M.G., Stanulla, M., Biondi, A., Mann, G., Locatelli,

F., Cazzaniga, G., Niggli, F., Aricò, M., Bartram, C.R., Attarbaschi, A., Silvestri, D., Beier, R., Basso, G., Ratei, R., Kulozik, A.E., Lo Nigro, L., Kremens, B., Greiner, J., Parasole, R., Harbott, J., Caruso, R., von Stackelberg, A., Barisone, E., Rössig, C., Conter, V., Schrappe, M., 2016. Dexamethasone vs prednisone in induction treatment of pediatric ALL: results of the randomized trial AIEOP-BFM ALL 2000. *Blood* 127, 2101–2112. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-670729>

Morrish, F., Neretti, N., Sedivy, J.M., Hockenbery, D.M., 2008. The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell Cycle* 7, 1054–1066. <https://doi.org/10.4161/cc.7.8.5739>

Mossé, Y.P., Lim, M.S., Voss, S.D., Wilner, K., Ruffner, K., Laliberte, J., Rolland, D., Balis, F.M., Maris, J.M., Weigel, B.J., Ingle, A.M., Ahern, C., Adamson, P.C., Blaney, S.M., 2013. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children’s Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol* 14, 472–480. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70095-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70095-0)

Mullighan, C.G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L.A.A., Miller, C.B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B.A., Harvey, R.C., Chen, I.-M., Clifford, R.J., Carroll, W.L., Reaman, G., Bowman, W.P., Devidas, M., Gerhard, D.S., Yang, W., Relling, M.V., Shurtleff, S.A., Campana, D., Borowitz, M.J., Pui, C.-H., Smith, M., Hunger, S.P., Willman, C.L., Downing, J.R., Children’s Oncology Group, 2009. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 360, 470–480. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808253>

Mullighan, C.G., Zhang, J., Kasper, L.H., Lerach, S., Payne-Turner, D., Phillips, L.A., Heatley, S.L., Holmfeldt, L., Collins-Underwood, J.R., Ma, J., Buetow, K.H., Pui, C.-H., Baker, S.D., Brindle, P.K., Downing, J.R., 2011. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 471, 235–239. <https://doi.org/10.1038/nature09727>

Neiman, P.E., Ruddell, A., Jasoni, C., Loring, G., Thomas, S.J., Brandvold, K.A., Lee Rm, null, Burnside, J., Delrow, J., 2001. Analysis of gene expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6378–6383. <https://doi.org/10.1073/pnas.111144898>

Nguyen, T.L., Nokin, M.-J., Terés, S., Tomé, M., Bodineau, C., Galmar, O., Pasquet, J.-M., Rousseau, B., van Liempd, S., Falcon-Perez, J.M., Richard, E., Muzotte, E., Rezvani, H.-R., Priault, M., Bouchecareilh, M., Redonnet-Vernhet, I., Calvo, J., Uzan, B., Pflumio, F., Fuentes, P., Toribio, M.L., Khatib, A.-M., Soubeyran, P., Murdoch, P.D.S., Durán, R.V., 2021. Downregulation of Glutamine Synthetase, not glutaminolysis, is responsible for glutamine addiction in Notch1-driven acute lymphoblastic leukemia. *Mol Oncol* 15, 1412–1431. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12877>

Numan, Y., Alfayez, M., Maiti, A., Alvarado, Y., Jabbour, E.J., Ferrajoli, A., Konoplev, S.N., Kantarjian, H.M., Bose, P., 2018. First Report of Clinical Response to Venetoclax in Early T-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO Precision Oncology* 1–6. <https://doi.org/10.1200/PO.18.00127>

O’Connor, D., Enshaei, A., Bartram, J., Hancock, J., Harrison, C.J., Hough, R., Samarasinghe, S., Schwab, C., Vora, A., Wade, R., Moppett, J., Moorman, A.V., Goulden, N., 2018. Genotype-Specific Minimal Residual Disease Interpretation Improves Stratification in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO* 36, 34–43. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.0449>

Oshima, K., Khiabani, H., da Silva-Almeida, A.C., Tzoneva, G., Abate, F., Ambesi-Impiombato, A., Sanchez-Martin, M., Carpenter, Z., Penson, A., Perez-Garcia, A., Eckert, C., Nicolas, C., Balbin, M., Sulis, M.L., Kato, M., Koh, K., Paganin, M., Basso, G., Gastier-Foster, J.M., Devidas, M., Loh, M.L., Kirschner-Schwabe, R., Palomero, T., Rabadan, R., Ferrando, A.A., 2016. Mutational landscape, clonal evolution patterns, and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 11306–11311.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1608420113>

Oshima, K., Zhao, J., Pérez-Durán, P., Brown, J.A., Patiño-Galindo, J.A., Chu, T., Quinn, A., Gunning, T., Belver, L., Ambesi-Impiombato, A., Tosello, V., Wang, Z., Sulis, M.L., Kato, M., Koh, K., Paganin, M., Basso, G., Balbin, M., Nicolas, C., Gastier-Foster, J.M., Devidas, M., Loh, M.L., Paietta, E., Tallman, M.S., Rowe, J.M., Litzow, M., Minden, M.D., Meijerink, J., Rabadan, R., Ferrando, A., 2020. Mutational and functional genetics mapping of chemotherapy resistance mechanisms in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Nat Cancer* 1, 1113–1127. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-00124-1>

Palomero, T., Lim, W.K., Odom, D.T., Sulis, M.L., Real, P.J., Margolin, A., Barnes, K.C., O’Neil, J., Neuberg, D., Weng, A.P., Aster, J.C., Sigaux, F., Soulier, J., Look, A.T., Young, R.A., Califano, A., Ferrando, A.A., 2006. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18261–18266. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606108103>

Papayannidis, C., DeAngelo, D.J., Stock, W., Huang, B., Shaik, M.N., Cesari, R., Zheng, X., Reynolds, J.M., English, P.A., Ozeck, M., Aster, J.C., Kuo, F., Huang, D., Lira, P.D., McLachlan, K.R., Kern, K.A., Garcia-Manero, G., Martinelli, G., 2015. A Phase 1 study of the novel gamma-secretase inhibitor PF-03084014 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma. *Blood Cancer J* 5, e350. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.80>

Park, S., Kim, G.W., Kwon, S.H., Lee, J.-S., 2020. Broad domains of histone H3 lysine 4 trimethylation in transcriptional regulation and disease. *The FEBS Journal* 287, 2891–2902. <https://doi.org/10.1111/febs.15219>

Parker, S.C.J., Stitzel, M.L., Taylor, D.L., Orozco, J.M., Erdos, M.R., Akiyama, J.A., van Bueren, K.L., Chines, P.S., Narisu, N., NISC Comparative Sequencing Program, Black, B.L., Visel, A., Pennacchio, L.A., Collins, F.S., National Institutes of Health Intramural Sequencing Center Comparative Sequencing Program Authors, NISC Comparative Sequencing Program Authors., Becker, J., Benjamin, B., Blakesley, R., Bouffard, G., Brooks, S., Coleman, H., Dekhtyar, M., Gregory, M., Guan, X., Gupta, J., Han, J., Hargrove, A., Ho, S., Johnson, T., Legaspi, R., Lovett, S., Maduro, Q., Masiello, C., Maskeri, B., McDowell, J., Montemayor, C., Mullikin, J., Park, M., Riebow, N., Schandler, K., Schmidt, B., Sison, C., Stantripop, M., Thomas, J., Thomas, P., Vemulapalli, M., Young, A., 2013. Chromatin stretch enhancer states drive cell-specific gene regulation and harbor human disease risk variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 17921–17926. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317023110>

Peirs, S., Van der Meulen, J., Van de Walle, I., Taghon, T., Speleman, F., Poppe, B., Van Vlierberghe, P., 2015. Epigenetics in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Immunol Rev* 263, 50–67. <https://doi.org/10.1111/imr.12237>

Peng, L.-J., Zhou, Y.-B., Geng, M., Bourova-Flin, E., Chuffart, F., Zhang, W.-N., Wang, T., Gao, M.-Q., Xi, M.-P., Cheng, Z.-Y., Zhang, J.-J., Liu, Y.-F., Chen, B., Khochbin, S., Wang, J., Rousseaux, S., Mi, J.-Q., 2022. Ectopic expression of a combination of 5 genes detects high risk forms of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *BMC Genomics* 23, 467. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08688-1>

Petit, A., Trinquand, A., Chevret, S., Ballerini, P., Cayuela, J.-M., Gardel, N., Touzart, A., Brethon, B., Lapillonne, H., Schmitt, C., Thouvenin, S., Michel, G., Preudhomme, C., Soulier, J., Landman-Parker, J., Leverger, G., Macintyre, E., Baruchel, A., Asnafi, V., French Acute Lymphoblastic Leukemia Study Group (FRALLE), 2018. Oncogenetic mutations combined with MRD improve outcome prediction in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 131, 289–300. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-778829>

Pieters, R., Carroll, W.L., 2008. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 55, 1–20, ix. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2007.11.002>

Pinkel, D., 1971. Five-year follow-up of “total therapy” of childhood lymphocytic leukemia.

JAMA 216, 648–652.

Piya, S., Yang, Y., Bhattacharya, S., Sharma, P., Ma, H., Mu, H., He, H., Ruvolo, V., Baran, N., Davis, R.E., Jain, A.K., Konopleava, M., Kantarjian, H., Andreeff, M., You, M.J., Borthakur, G., 2022. Targeting the NOTCH1-MYC-CD44 axis in leukemia-initiating cells in T-ALL. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01516-1>

Place, A.E., Pikman, Y., Stevenson, K.E., Harris, M.H., Pauly, M., Sulis, M.-L., Hijiya, N., Gore, L., Cooper, T.M., Loh, M.L., Roti, G., Neuberg, D.S., Hunt, S.K., Orloff-Parry, S., Stegmaier, K., Sallan, S.E., Silverman, L.B., 2018. Phase I trial of the mTOR inhibitor everolimus in combination with multi-agent chemotherapy in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer* 65, e27062. <https://doi.org/10.1002/pbc.27062>

Pui, C.-H., Campana, D., Pei, D., Bowman, W.P., Sandlund, J.T., Kaste, S.C., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J.E., Raimondi, S.C., Onciu, M., Coustan-Smith, E., Kun, L.E., Jeha, S., Cheng, C., Howard, S.C., Simmons, V., Bayles, A., Metzger, M.L., Boyett, J.M., Leung, W., Handgretinger, R., Downing, J.R., Evans, W.E., Relling, M.V., 2009. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N. Engl. J. Med.* 360, 2730–2741. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900386>

Pullarkat, V.A., Lacayo, N.J., Jabbour, E., Rubnitz, J.E., Bajel, A., Laetsch, T.W., Leonard, J., Colace, S.I., Khaw, S.L., Fleming, S.A., Mattison, R.J., Norris, R., Opferman, J.T., Roberts, K.G., Zhao, Y., Qu, C., Badawi, M., Schmidt, M., Tong, B., Pesko, J.C., Sun, Y., Ross, J.A., Vishwamitra, D., Rosenwinkel, L., Kim, S.Y., Jacobson, A., Mullighan, C.G., Alexander, T.B., Stock, W., 2021. Venetoclax and Navitoclax in Combination with Chemotherapy in Patients with Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma. *Cancer Discovery* 11, 1440–1453. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1465>

Raanani, P., Trakhtenbrot, L., Rechavi, G., Rosenthal, E., Avigdor, A., Brok-Simoni, F., Leiba, M., Amariglio, N., Nagler, A., Ben-Bassat, I., 2005. Philadelphia-Chromosome-Positive T-Lymphoblastic Leukemia: Acute Leukemia or Chronic Myelogenous Leukemia Blastic Crisis. *ASH* 113, 181–189. <https://doi.org/10.1159/000084448>

Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J.C., MacDonald, H.R., 2004. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5, 247–253. <https://doi.org/10.1038/ni1045>

Raetz, E.A., Borowitz, M.J., Devidas, M., Linda, S.B., Hunger, S.P., Winick, N.J., Camitta, B.M., Gaynon, P.S., Carroll, W.L., 2016. Reinduction Platform for Children With First Marrow Relapse of Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children’s Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.1414>

Raetz, E.A., Teachey, D.T., Minard, C., Liu, X., Norris, R., Reid, J., Beeles, T., Gore, L., Fox, E., Loh, M.L., Weigel, B.J., Carroll, W.L., 2020. Safety of Palbociclib in Combination with Chemotherapy in Pediatric and Young Adult Patients with Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoma: A Children’s Oncology Group Pilot Study. *Blood* 136, 20–21. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-141572>

Ragg, S., Zehentner, B.K., Loken, M.R., Croop, J.M., 2019. Evidence for BCR/ABL1-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia arising in an early lymphoid progenitor cell. *Pediatric Blood & Cancer* 66, e27829. <https://doi.org/10.1002/pbc.27829>

Rehe, K., Wilson, K., Bomken, S., Williamson, D., Irving, J., den Boer, M.L., Stanulla, M., Schrappe, M., Hall, A.G., Heidenreich, O., Vormoor, J., 2013. Acute B lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. *EMBO Mol Med* 5, 38–51. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201703>

Reismüller, B., Attarbaschi, A., Peters, C., Dworzak, M.N., Pötschger, U., Urban, C., Fink, F.-M., Meister, B., Schmitt, K., Dieckmann, K., Henze, G., Haas, O.A., Gadner, H., Mann, G., Group, on behalf of the A.B.-F.-M. (BFM) S., 2009. Long-term outcome of initially

homogenously treated and relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia in Austria – A population-based report of the Austrian Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Study Group. *British Journal of Haematology* 144, 559–570. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07499.x>

Reizis, B., Leder, P., 2002. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev.* 16, 295–300. <https://doi.org/10.1101/gad.960702>

Rheingold, S.R., Ji, L., Xu, X., Devidas, M., Brown, P.A., Gore, L., Winick, N.J., Carroll, W.L., Hunger, S., Raetz, E.A., Loh, M.L., Bhojwani, D., 2019. Prognostic factors for survival after relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL): A Children’s Oncology Group (COG) study. *JCO* 37, 10008–10008. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.10008

Ribera, J.-M., Oriol, A., Sanz, M.-A., Tormo, M., Fernández-Abellán, P., del Potro, E., Abella, E., Bueno, J., Parody, R., Bastida, P., Grande, C., Heras, I., Bethencourt, C., Feliu, E., Ortega, J.-J., 2008. Comparison of the Results of the Treatment of Adolescents and Young Adults With Standard-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia With the Programa Español de Tratamiento en Hematología Pediatric-Based Protocol ALL-96. *JCO* 26, 1843–1849. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.7265>

Richter-Pechańska, P., Kunz, J.B., Hof, J., Zimmermann, M., Rausch, T., Bandapalli, O.R., Orlova, E., Scapinello, G., Sagi, J.C., Stanulla, M., Schrappe, M., Cario, G., Kirschner-Schwabe, R., Eckert, C., Benes, V., Korbelt, J.O., Muckenthaler, M.U., Kulozik, A.E., 2017. Identification of a genetically defined ultra-high-risk group in relapsed pediatric T-lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Journal* 7, e523. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.3>

Rowe, J.M., Buck, G., Burnett, A.K., Chopra, R., Wiernik, P.H., Richards, S.M., Lazarus, H.M., Franklin, I.M., Litzow, M.R., Ciobanu, N., Prentice, H.G., Durrant, J., Tallman, M.S., Goldstone, A.H., for ECOG and the MRC/NCRI Adult Leukemia Working Party, 2005. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood* 106, 3760–3767. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1623>

Sallman, D.A., DeZern, A.E., Garcia-Manero, G., Steensma, D.P., Roboz, G.J., Sekeres, M.A., Cluzeau, T., Sweet, K.L., McLemore, A., McGraw, K.L., Puskas, J., Zhang, L., Yao, J., Mo, Q., Nardelli, L., Al Ali, N.H., Padron, E., Korbelt, G., Attar, E.C., Kantarjian, H.M., Lancet, J.E., Fenaux, P., List, A.F., Komrokji, R.S., 2021. Eprenetapopt (APR-246) and Azacitidine in TP53-Mutant Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* 39, 1584–1594. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02341>

Sambandam, A., Maillard, I., Zediak, V.P., Xu, L., Gerstein, R.M., Aster, J.C., Pear, W.S., Bhandoola, A., 2005. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* 6, 663–670. <https://doi.org/10.1038/ni1216>

Sanchez-Martin, M., Ferrando, A., 2017. The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 129, 1124–1133. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-692582>

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C.T., Schreiber, S.L., Mellor, J., Kouzarides, T., 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407–411. <https://doi.org/10.1038/nature01080>

Sarry, J.-E., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P.V., Secretò, A., Keefer, C., Swider, C.R., Strzelecki, A.-C., Cavellier, C., Récher, C., Mas, V.M.-D., Delabesse, E., Danet-Desnoyers, G., Carroll, M., 2011. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ c-deficient mice. *J Clin Invest* 121, 384–395. <https://doi.org/10.1172/JCI41495>

Schmitt, T.M., Zúñiga-Pflücker, J.C., 2002. Induction of T Cell Development from Hematopoietic Progenitor Cells by Delta-like-1 In Vitro. *Immunity* 17, 749–756. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00474-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00474-0)

Schrappé, M., Reiter, A., Zimmermann, M., Harbott, J., Ludwig, W.D., Henze, G., Gadner, H., Odenwald, E., Riehm, H., 2000. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. *Berlin-Frankfurt-Münster. Leukemia* 14, 2205–2222. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401973>

Schrappé, M., Valsecchi, M.G., Bartram, C.R., Schrauder, A., Panzer-Grümayer, R., Möricke, A., Parasole, R., Zimmermann, M., Dworzak, M., Buldini, B., Reiter, A., Basso, G., Klingebiel, T., Messina, C., Ratei, R., Cazzaniga, G., Koehler, R., Locatelli, F., Schäfer, B.W., Aricò, M., Welte, K., van Dongen, J.J.M., Gadner, H., Biondi, A., Conter, V., 2011. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 118, 2077–2084. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-338707>

Senft, D., Jeremias, I., 2019. A rare subgroup of leukemia stem cells harbors relapse-inducing potential in acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Hematology* 69, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.09.006>

Senkevitch, E., Li, W., Hixon, J.A., Andrews, C., Cramer, S.D., Pauly, G.T., Back, T., Czarra, K., Durum, S.K., 2018. Inhibiting Janus Kinase 1 and BCL-2 to treat T cell acute lymphoblastic leukemia with IL7-R α mutations. *Oncotarget* 9, 22605–22617. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25194>

Sharma, V.M., Calvo, J.A., Draheim, K.M., Cunningham, L.A., Hermance, N., Beverly, L., Krishnamoorthy, V., Bhasin, M., Capobianco, A.J., Kelliher, M.A., 2006. Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol* 26, 8022–8031. <https://doi.org/10.1128/MCB.01091-06>

Shilatifard, A., 2012. The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu Rev Biochem* 81, 65–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051710-134100>

Shiraz, P., Jehangir, W., Agrawal, V., 2021. T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia—Current Concepts in Molecular Biology and Management. *Biomedicines* 9, 1621. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111621>

Silverman, L.B., Declerck, L., Gelber, R.D., Dalton, V.K., Asselin, B.L., Barr, R.D., Clavell, L.A., Hurwitz, C.A., Moghrabi, A., Samson, Y., Schorin, M.A., Lipton, J.M., Cohen, H.J., Sallan, S.E., 2000. Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). *Leukemia* 14, 2247–2256. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401980>

Simonin, M., Asnafi, V., 2021. De la biologie aux perspectives thérapeutiques innovantes dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T 6.

Simonin, M., Gueguen, G., Strullu, M., 2019a. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie* 22, 96–107. <https://doi.org/10.1684/mtp.2019.0717>

Simonin, M., Gueguen, G., Strullu, M., 2019b. Les leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie* 22, 96–107. <https://doi.org/10.1684/mtp.2019.0717>

Simonin, M., Lhermitte, L., Dourthe, M.-E., Lengline, E., Graux, C., Grardel, N., Cayuela, J.-M., Arnoux, I., Gandemer, V., Ifrah, N., Dombret, H., Baruchel, A., Macintyre, E.A., Petit, A., Boissel, N., Asnafi, V., 2020. IKZF1 alterations predict poor prognosis in adult and pediatric T-ALL. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007959>

Smith, M., Arthur, D., Camitta, B., Carroll, A.J., Crist, W., Gaynon, P., Gelber, R., Heerema, N., Korn, E.L., Link, M., Murphy, S., Pui, C.H., Pullen, J., Reamon, G., Sallan, S.E., Sather, H., Shuster, J., Simon, R., Trigg, M., Tubergen, D., Uckun, F., Ungerleider, R., 1996. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 14, 18–24. <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.1.18>

Stein, E.M., DiNardo, C.D., Pollyea, D.A., Fathi, A.T., Roboz, G.J., Altman, J.K., Stone, R.M., DeAngelo, D.J., Levine, R.L., Flinn, I.W., Kantarjian, H.M., Collins, R., Patel, M.R., Frankel,

A.E., Stein, A., Sekeres, M.A., Swords, R.T., Medeiros, B.C., Willekens, C., Vyas, P., Tosolini, A., Xu, Q., Knight, R.D., Yen, K.E., Agresta, S., de Botton, S., Tallman, M.S., 2017. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 130, 722–731. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-779405>

Stengel, A., Kern, W., Haferlach, T., Meggendorfer, M., Fasan, A., Haferlach, C., 2017. The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases. *Leukemia* 31, 705–711. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.263>

Stock, W., La, M., Sanford, B., Bloomfield, C.D., Vardiman, J.W., Gaynon, P., Larson, R.A., Nachman, J., Children’s Cancer Group, Cancer and Leukemia Group B studies, 2008. What determines the outcomes for adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia treated on cooperative group protocols? A comparison of Children’s Cancer Group and Cancer and Leukemia Group B studies. *Blood* 112, 1646–1654. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-130237>

Stock, W., Luger, S.M., Advani, A.S., Yin, J., Harvey, R.C., Mullighan, C.G., Willman, C.L., Fulton, N., Laumann, K.M., Malnassy, G., Paietta, E., Parker, E., Geyer, S., Mrózek, K., Bloomfield, C.D., Sanford, B., Marcucci, G., Liedtke, M., Claxton, D.F., Foster, M.C., Bogart, J.A., Grecula, J.C., Appelbaum, F.R., Erba, H., Litzow, M.R., Tallman, M.S., Stone, R.M., Larson, R.A., 2019. A pediatric regimen for older adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia: results of CALGB 10403. *Blood* 133, 1548–1559. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-881961>

Taj, M.M., Moorman, A.V., Hamadeh, L., Petit, A., Asnafi, V., Alby-Laurent, F., Vora, A., Mansour, M.R., Gale, R., Chevret, S., Moppett, J., Baruchel, A., Macintyre, E., 2022. Prognostic value of Oncogenetic mutations in pediatric T Acute Lymphoblastic Leukemia: a comparison of UKALL2003 and FRALLE2000T protocols. *Leukemia* 36, 263–266. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01334-x>

Tan, B.T., Park, C.Y., Ailles, L.E., Weissman, I.L., 2006. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest* 86, 1203–1207. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700488>

Teachey, D.T., Devidas, M., Wood, B.L., Chen, Z., Hayashi, R.J., Annett, R.D., Asselin, B.L., August, K.J., Cho, S.Y., Dunsmore, K.P., Fisher, B.T., Freedman, J.L., Galardy, P.J., Harker-Murray, P., Hermiston, M.L., Horton, T.M., Jaju, A.I., Lam, A., Messinger, Y.H., Miles, R.R., Okada, M., Patel, S.I., Schafer, E.S., Schechter-Finkelstein, T., Shimano, K.A., Singh, N., Steele, A.C., Sulis, M.L., Vargas, S.L., Winter, S.S., Wood, C., McKay, P.Z., Bollard, C.M., Loh, M.L., Hunger, S.P., Raetz, E.A., 2020. Cranial Radiation Can be Eliminated in Most Children with T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) and Bortezomib Potentially Improves Survival in Children with T-Cell Lymphoblastic Lymphoma (T-LL): Results of Children’s Oncology Group (COG) Trial AALL1231. *Blood* 136, 11–12. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-134730>

Teachey, D.T., Devidas, M., Wood, B.L., Chen, Z., Hayashi, R.J., Hermiston, M.L., Annett, R.D., Archer, J.H., Asselin, B.L., August, K.J., Cho, S.Y., Dunsmore, K.P., Fisher, B.T., Freedman, J.L., Galardy, P.J., Harker-Murray, P., Horton, T.M., Jaju, A.I., Lam, A., Messinger, Y.H., Miles, R.R., Okada, M., Patel, S.I., Schafer, E.S., Schechter, T., Singh, N., Steele, A.C., Sulis, M.L., Vargas, S.L., Winter, S.S., Wood, C., Zweidler-McKay, P., Bollard, C.M., Loh, M.L., Hunger, S.P., Raetz, E.A., 2022. Children’s Oncology Group Trial AALL1231: A Phase III Clinical Trial Testing Bortezomib in Newly Diagnosed T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02678>

Teachey, D.T., O’Connor, D., 2020. How I treat newly diagnosed T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma in children. *Blood* 135, 159–166. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001557>

Teachey, D.T., Pui, C.-H., 2019. Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology* 20, e142–e154. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30031-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30031-2)

Tesio, M., Trinquand, A., Ballerini, P., Hypolite, G., Lhermitte, L., Petit, A., Ifrah, N., Baruchel, A., Dombret, H., Macintyre, E., Asnafi, V., 2017. Age-related clinical and biological features of PTEN abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 31, 2594–2600. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.157>

Tessoulin, B., Descamps, G., Moreau, P., Maïga, S., Lodé, L., Godon, C., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Le Gouill, S., Amiot, M., Pellat-Deceunynck, C., 2014. PRIMA-1Met induces myeloma cell death independent of p53 by impairing the GSH/ROS balance. *Blood* 124, 1626–1636. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-548800>

Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., Zhao, J.J., 2015. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* 15, 7–24. <https://doi.org/10.1038/nrc3860>

Tian, X.-P., Xie, D., Huang, W.-J., Ma, S.-Y., Wang, L., Liu, Y.-H., Zhang, X., Huang, H.-Q., Lin, T.-Y., Rao, H.-L., Li, M., Liu, F., Zhang, F., Zhong, L.-Y., Liang, L., Lan, X.-L., Li, J., Liao, B., Li, Z.-H., Tang, Q.-L., Liang, Q., Shao, C.-K., Zhai, Q.-L., Cheng, R.-F., Sun, Q., Ru, K., Gu, X., Lin, X.-N., Yi, K., Shuang, Y.-R., Chen, X.-D., Dong, W., Sang, W., Sun, C., Liu, H., Zhu, Z.-G., Rao, J., Guo, Q.-N., Zhou, Y., Meng, X.-L., Zhu, Y., Hu, C.-L., Jiang, Y.-R., Zhang, Y., Gao, H.-Y., He, W.-J., Xia, Z.-J., Pan, X.-Y., Lan, H., Li, G.-W., Liu, L., Bao, H.-Z., Song, L.-Y., Kang, T.-B., Cai, Q.-Q., 2020. A gene-expression-based signature predicts survival in adults with T-cell lymphoblastic lymphoma: a multicenter study. *Leukemia* 34, 2392–2404. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0757-5>

Touzart, A., Mayakonda, A., Smith, C., Hey, J., Toth, R., Cieslak, A., Andrieu, G.P., Tran Quang, C., Latiri, M., Ghysdael, J., Spicuglia, S., Dombret, H., Ifrah, N., Macintyre, E., Lutsik, P., Boissel, N., Plass, C., Asnafi, V., 2021. Epigenetic analysis of patients with T-ALL identifies poor outcomes and a hypomethylating agent-responsive subgroup. *Sci Transl Med* 13, eabc4834. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc4834>

Tran Quang, C., Zaniboni, B., Humeau, R., Lengliné, E., Dourthe, M.E., Ganesan, R., Singh, S., Scheer, J.M., Asnafi, V., Ghysdael, J., 2020. Preclinical efficacy of humanized, non-FcγR-binding anti-CD3 antibodies in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 136, 1298–1302. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003801>

Trimarchi, T., Bilal, E., Ntziachristos, P., Fabbri, G., Dalla-Favera, R., Tsirigos, A., Aifantis, I., 2014. Genome-wide Mapping and Characterization of Notch-Regulated Long Noncoding RNAs in Acute Leukemia. *Cell* 158, 593–606. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.049>

Trinquand, A., Dos Santos, N.R., Tran Quang, C., Rocchetti, F., Zaniboni, B., Belhocine, M., Da Costa de Jesus, C., Lhermitte, L., Tesio, M., Dussiot, M., Cosset, F.-L., Verhoeyen, E., Pflumio, F., Ifrah, N., Dombret, H., Spicuglia, S., Chatenoud, L., Gross, D.-A., Hermine, O., Macintyre, E., Ghysdael, J., Asnafi, V., 2016. Triggering the TCR Developmental Checkpoint Activates a Therapeutically Targetable Tumor Suppressive Pathway in T-cell Leukemia. *Cancer Discov* 6, 972–985. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0675>

Trinquand, A., Plesa, A., Abdo, C., Subtil, F., Aladjidi, N., Rigaud, C., Touzart, A., Lhermitte, L., Petit, A., Michaux, K., Jung, C., Chassagne-Clement, C., Asnafi, V., Bertrand, Y., Garnier, N., Macintyre, E., 2021. Toward Pediatric T Lymphoblastic Lymphoma Stratification Based on Minimal Disseminated Disease and NOTCH1/FBXW7 Status. *Hemasphere* 5, e641. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000641>

Trinquand, A., Tanguy-Schmidt, A., Ben Abdelali, R., Lambert, J., Beldjord, K., Lengliné, E., De Gunzburg, N., Payet-Bornet, D., Lhermitte, L., Mossafa, H., Lhéritier, V., Bond, J., Huguet, F., Buzyn, A., Leguay, T., Cahn, J.-Y., Thomas, X., Chalandon, Y., Delannoy, A., Bonmati, C., Maury, S., Nadel, B., Macintyre, E., Ifrah, N., Dombret, H., Asnafi, V., 2013a. Toward a

NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J. Clin. Oncol.* 31, 4333–4342. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.5292>

Trinquand, A., Tanguy-Schmidt, A., Ben Abdelali, R., Lambert, J., Beldjord, K., Lengliné, E., De Gunzburg, N., Payet-Bornet, D., Lhermitte, L., Mossafa, H., Lhéritier, V., Bond, J., Huguet, F., Buzyn, A., Leguay, T., Cahn, J.-Y., Thomas, X., Chalandon, Y., Delannoy, A., Bonmati, C., Maury, S., Nadel, B., Macintyre, E., Ifrah, N., Dombret, H., Asnafi, V., 2013b. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J. Clin. Oncol.* 31, 4333–4342. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.5292>

Tzoneva, G., Dieck, C.L., Oshima, K., Ambesi-Impiombato, A., Sánchez-Martín, M., Madubata, C.J., Khiabani, H., Yu, J., Waanders, E., Iacobucci, I., Sulis, M.L., Kato, M., Koh, K., Paganin, M., Basso, G., Gastier-Foster, J.M., Loh, M.L., Kirschner-Schwabe, R., Mullighan, C.G., Rabadan, R., Ferrando, A.A., 2018. Clonal evolution mechanisms in NT5C2 mutant-relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 553, 511–514. <https://doi.org/10.1038/nature25186>

Tzoneva, G., Perez-Garcia, A., Carpenter, Z., Khiabani, H., Tosello, V., Allegretta, M., Paietta, E., Racevskis, J., Rowe, J.M., Tallman, M.S., Paganin, M., Basso, G., Hof, J., Kirschner-Schwabe, R., Palomero, T., Rabadan, R., Ferrando, A., 2013. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat. Med.* 19, 368–371. <https://doi.org/10.1038/nm.3078>

Van Vlierberghe, P., Ferrando, A., 2012. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* 122, 3398–3406. <https://doi.org/10.1172/JCI61269>

Vermeulen, L., Todaro, M., de Sousa Mello, F., Sprick, M.R., Kemper, K., Perez Alea, M., Richel, D.J., Stassi, G., Medema, J.P., 2008. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13427–13432. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805706105>

Vicente, C., Cools, J., 2015. The origin of relapse in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100, 1373–1375. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.136077>

Visvader, J.E., 2011. Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314–322. <https://doi.org/10.1038/nature09781>

Vora, A., Goulden, N., Mitchell, C., Hancock, J., Hough, R., Rowntree, C., Moorman, A.V., Wade, R., 2014. Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 15, 809–818. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70243-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70243-8)

Vora, A., Wade, R., Mitchell, C.D., Goulden, N., Richards, S., 2008. Improved Outcome for Children and Young Adults with T-Cell Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): Results of the United Kingdom Medical Research Council (MRC) Trial UKALL 2003. *Blood* 112, 908. <https://doi.org/10.1182/blood.V112.11.908.908>

Vora, A., Ward, R., Payne, J., Mitchell, C., Eden, T., Kinsey, S., Lilleyman, J., Richards, S., 2006. Benefit of Targeted Intensification for NCI High Risk Childhood Lymphoblastic Leukaemia: Results of the United Kingdom Medical Research Council Trial ALL97 and ALL97/99. *Blood* 108, 1869. <https://doi.org/10.1182/blood.V108.11.1869.1869>

Vormoor, B., Veal, G.J., Griffin, M.J., Boddy, A.V., Irving, J., Minto, L., Case, M., Banerji, U., Swales, K.E., Tall, J.R., Moore, A.S., Toguchi, M., Acton, G., Dyer, K., Schwab, C., Harrison, C.J., Grainger, J.D., Lancaster, D., Kearns, P., Hargrave, D., Vormoor, J., 2017. A phase I/II trial of AT9283, a selective inhibitor of aurora kinase in children with relapsed or refractory acute leukemia: challenges to run early phase clinical trials for children with leukemia. *Pediatric Blood & Cancer* 64, e26351. <https://doi.org/10.1002/pbc.26351>

Wang, S., He, G., 2016. 2016 Revision to the WHO classification of acute lymphoblastic leukemia. *J Transl Int Med* 4, 147–149. <https://doi.org/10.1515/jtim-2016-0040>

Wendorff, A.A., Koch, U., Wunderlich, F.T., Wirth, S., Dubey, C., Brüning, J.C., MacDonald, H.R., Radtke, F., 2010. Hes1 Is a Critical but Context-Dependent Mediator of Canonical Notch Signaling in Lymphocyte Development and Transformation. *Immunity* 33, 671–684. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.014>

Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., Aster, J.C., 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269–271. <https://doi.org/10.1126/science.1102160>

Weng, A.P., Millholland, J.M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M.L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Tobias, J., Li, Y., Wolfe, M.S., Shachaf, C., Felsher, D., Blacklow, S.C., Pear, W.S., Aster, J.C., 2006. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* 20, 2096–2109. <https://doi.org/10.1101/gad.1450406>

Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., Artavanis-Tsakonas, S., 1985. Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 567–581. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90229-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90229-6)

Whitlock, J., dalla Pozza, L., Goldberg, J.M., Silverman, L.B., Ziegler, D.S., Attarbaschi, A., Brown, P., Gardner, R.A., Gaynon, P.S., Hutchinson, R.J., Marcus, L.J., Messinger, Y.H., Schultz, K.R., Vandergiesen, J., Eckroth, E., Locatelli, F., Zwaan, C.M., Wood, B.L., Sposto, R., Gore, L., 2014. Nelarabine in Combination with Etoposide and Cyclophosphamide Is Active in First Relapse of Childhood T-Acute Lymphocytic Leukemia (T-ALL) and T-Lymphoblastic Lymphoma (T-LL). *Blood* 124, 795. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.795.795>

Wilson, A., MacDonald, H.R., Radtke, F., 2001. Notch 1–Deficient Common Lymphoid Precursors Adopt a B Cell Fate in the Thymus. *Journal of Experimental Medicine* 194, 1003–1012. <https://doi.org/10.1084/jem.194.7.1003>

Wilson, W.H., O'Connor, O.A., Czuczman, M.S., LaCasce, A.S., Gerecitano, J.F., Leonard, J.P., Tulpule, A., Dunleavy, K., Xiong, H., Chiu, Y.-L., Cui, Y., Busman, T., Elmore, S.W., Rosenberg, S.H., Krivoshik, A.P., Enschede, S.H., Humerickhouse, R.A., 2010. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol* 11, 1149–1159. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70261-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70261-8)

Winter, S.S., Dunsmore, K.P., Devidas, M., Wood, B.L., Esiashvili, N., Chen, Z., Eisenberg, N., Briegel, N., Hayashi, R.J., Gastier-Foster, J.M., Carroll, A.J., Heerema, N.A., Asselin, B.L., Gaynon, P.S., Borowitz, M.J., Loh, M.L., Rabin, K.R., Raetz, E.A., Zweidler-Mckay, P.A., Winick, N.J., Carroll, W.L., Hunger, S.P., 2018. Improved Survival for Children and Young Adults With T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia: Results From the Children's Oncology Group AALL0434 Methotrexate Randomization. *JCO* 36, 2926–2934. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.7250>

Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H.R., Radtke, F., 2002. Inactivation of Notch1 Impairs VDJ β Rearrangement and Allows pre-TCR-Independent Survival of Early $\alpha\beta$ Lineage Thymocytes. *Immunity* 16, 869–879. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00330-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00330-8)

Wood, B.L., Winter, S.S., Dunsmore, K.P., Devidas, M., Chen, S., Asselin, B., Esiashvili, N., Loh, M.L., Winick, N.J., Carroll, W.L., Raetz, E.A., Hunger, S.P., 2014. T-Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) Shows Excellent Outcome, Lack of Significance of the Early Thymic Precursor (ETP) Immunophenotype, and Validation of the Prognostic Value of End-Induction Minimal Residual Disease (MRD) in Children's Oncology Group (COG) Study AALL0434. *Blood* 124, 1–1.

Yadav, B.D., Samuels, A.L., Wells, J.E., Sutton, R., Venn, N.C., Bendak, K., Anderson, D., Marshall, G.M., Cole, C.H., Beesley, A.H., Kees, U.R., Lock, R.B., 2016. Heterogeneity in mechanisms of emergent resistance in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* 7, 58728–58742. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11233>

Yashiro-Ohtani, Y., He, Y., Ohtani, T., Jones, M.E., Shestova, O., Xu, L., Fang, T.C., Chiang, M.Y., Intlekofer, A.M., Blacklow, S.C., Zhuang, Y., Pear, W.S., 2009. Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes Dev.* 23, 1665–1676. <https://doi.org/10.1101/gad.1793709>

Yashiro-Ohtani, Y., Wang, H., Zang, C., Arnett, K.L., Bailis, W., Ho, Y., Knoechel, B., Lanauze, C., Louis, L., Forsyth, K.S., Chen, S., Chung, Y., Schug, J., Blobel, G.A., Liebhaber, S.A., Bernstein, B.E., Blacklow, S.C., Liu, X.S., Aster, J.C., Pear, W.S., 2014. Long-range enhancer activity determines Myc sensitivity to Notch inhibitors in T cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E4946-4953. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407079111>

Yatim, A., Benne, C., Sobhian, B., Laurent-Chabalier, S., Deas, O., Judde, J.-G., Lelievre, J.-D., Levy, Y., Benkirane, M., 2012. NOTCH1 Nuclear Interactome Reveals Key Regulators of Its Transcriptional Activity and Oncogenic Function. *Molecular Cell* 48, 445–458. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.022>

Zappone, E., Cencini, E., Defina, M., Sicuranza, A., Gozzetti, A., Ciofini, S., Raspadori, D., Mecacci, B., Bocchia, M., 2020. Venetoclax in association with decitabine as effective bridge to transplant in a case of relapsed early T-cell lymphoblastic leukemia. *Clinical Case Reports* 8, 2000–2002. <https://doi.org/10.1002/ccr3.3041>

Zhang, M., Yang, L., Fu, X., Zhang, L., Meng, H., Li, L., Li, X., Wang, X., Sun, Z., Yu, H., Li, Z., Nan, F., Chang, Y., Zhou, Z., Yan, J., Li, J., Wang, M., You, F., Chen, Y.-S., Zhang, B., 2020. First-in-human clinical trial of the autologous CD7-CART for relapsed/refractory ACUTE lymphoblastic leukemia/lymphoma. *JCO* 38, 3026–3026. https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.3026

Zhou, B., Lin, W., Long, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wu, K., Chu, Q., 2022. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Sig Transduct Target Ther* 7, 95. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00934-y>

Zwaan, C.M., Kowalczyk, J., Schmitt, C., Bielorai, B., Russo, M.W., Woessner, M., Ranganathan, S., Leverger, G., 2017. Safety and efficacy of nelarabine in children and young adults with relapsed or refractory T-lineage acute lymphoblastic leukaemia or T-lineage lymphoblastic lymphoma: results of a phase 4 study. *Br J Haematol* 179, 284–293. <https://doi.org/10.1111/bjh.14874>