



HAL
open science

Génomique des hémopathies malignes

Julien Broséus

► **To cite this version:**

Julien Broséus. Génomique des hémopathies malignes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2020. tel-02983653

HAL Id: tel-02983653

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02983653v1>

Submitted on 30 Oct 2020

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

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Génomique des hémopathies malignes

**Mémoire présenté et soutenu publiquement pour l'obtention du
diplôme**

D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Le 20 octobre 2020

Par Julien BROSÉUS

CNU sous-section 47-01

Membres du jury :

Rapporteurs :	Karin TARTE	PU-PH, Université de Rennes
	Fanny BARAN-MARSZAK	PU-PH, Université Paris-Nord
	Éric SOLARY	PU-PH, Université Paris-Saclay
Examineurs:	Catherine THIEBLEMONT	PU-PH, Université Paris-Diderot, Présidente
	Bertrand NADEL	DR Inserm, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy
	Pierre FEUGIER	PU-PH, Université de Lorraine, Parrain scientifique

Parrain scientifique : Pierre FEUGIER

PU-PH, Hématologie, CHRU de Nancy

Université de Lorraine, Inserm UMR 1256, Nancy

UMR Inserm 1256 – Nutrition Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux.

Université de Lorraine – Faculté de Médecine

9 Avenue de la Forêt de Haye – CD 50184 – 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex

Table des Matières

1. CURRICULUM VITAE	12
1.1. INFORMATIONS GENERALES	12
1.2. DIPLOMES ET TITRES UNIVERSITAIRES.....	13
1.3. FORMATION PRATIQUE HOSPITALIERE	14
1.4. FORMATION PAR LA RECHERCHE ACADEMIQUE	15
1.5. PUBLICATIONS	17
2. ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT	22
2.1. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT UNIVERSITAIRE.....	22
2.2. ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT HOSPITALIER.....	24
2.3. RECHERCHE EN PEDAGOGIE MEDICALE	25
2.4. PRODUCTIVITE SIDES	27
2.5. BUREAU DE DOCIMOLOGIE - FACULTE DE MEDECINE DE NANCY.....	27
2.6. COMMISSION PEDAGOGIE NUMERIQUE	28
2.7. SCORE SIAPS (SCORE INDIVIDUEL D'APTITUDE PEDAGOGIQUE EN SANTE)	30
3. RESPONSABILITÉS ET MANDATS ÉLECTIFS	32
3.1. RESPONSABILITES HOSPITALIERES	32
3.2. RESPONSABILITES EN RECHERCHE	32
3.3. RESPONSABILITES UNIVERSITAIRES.....	32
3.4. PARTICIPATION A DES GROUPES COLLABORATEURS	32
4. ACTIVITÉS DE RECHERCHE	33
4.1. INTERNAT DE BIOLOGIE MEDICALE ET MASTER II RECHERCHE	33
4.2. ASSISTANAT EN HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE ET THESE D'UNIVERSITE (2012-2016).....	33
4.2.1. Étude génomique des syndromes myéloprolifératifs et des syndromes mixtes myéloprolifératifs/myélodysplasiques.....	34
4.2.2. Étude génomique des lymphomes B-Diffus à Grandes Cellules (LBDGC) en rechute	43
4.3. ENCADREMENT D'ETUDIANTS (2015-2021)	44
4.3.1. Stages d'Initiation à la Recherche (SIR).....	44
4.3.2. Master	44
4.3.3. Thèses d'État et thèses d'Université.....	45
4.3.4. Valorisation du travail des étudiants encadrés.....	45
4.4. DEMANDE D'AUTORISATION A CO-ENCADRER UNE THESE (JANVIER 2019).....	48
4.5. MISSION DE LONGUE DUREE : MOBILITE A ULM (2017-2018)	54

Dr Julien BROSEUS

4.6.	RECHERCHE POST-DOCTORALE : EVOLUTION SOUS-CLONALE SPONTANEE AU COURS DE L'HISTOIRE NATURELLE DE LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE DE STADE A SELON LA CLASSIFICATION DE BINET.	56
5.	PROJET DE RECHERCHE : GÉNOMIQUE DES HÉMOPATHIES MALIGNES	59
5.1.	PROJET A COURT TERME : GENOMIQUE INTEGRATIVE DDES LYMPHOMES B-DIFFUS A GRANDES CELLULES (LBDGC) PRIMITIFS EN RECHUTE.....	60
5.1.1.	<i>Étude génomique intégrative des LBDGC en rechute issus de l'étude CORAL.....</i>	60
5.1.2.	<i>Étude génomique des LBDGC en rechute en fonction des anomalies du gène MYC.....</i>	60
5.2.	PROJET A MOYEN ET A LONG TERME : GENOMIQUE INTEGRATIVE DE LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE (LLC) ET DU SYNDROME DE RICHTER (SR).....	61
5.2.1.	<i>La Leucémie lymphoïde chronique (LLC).....</i>	61
5.2.2.	<i>Le syndrome de Richter (SR)</i>	66
5.2.3.	<i>Étude de l'évolution tumorale de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en syndrome de Richter (SR)71</i>	
5.3.	PROJET A MOYEN ET A LONG TERME : ÉTUDE GENOMIQUE ET PROTEOMIQUE DU SYNDROME DE RICHTER	75
5.3.1.	<i>Étude du méthylome du syndrome de Richter</i>	76
5.3.2.	<i>Étude transcriptomique du Syndrome de Richter</i>	78
5.3.3.	<i>Étude protéomique du Syndrome de Richter</i>	80
5.3.4.	<i>Étude des facteurs pronostiques moléculaires dans le Syndrome de Richter</i>	86
5.4.	PROJET A MOYEN ET A LONG TERME : ÉVALUATION DE L'INTERET DE L'ÉTUDE DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT POUR LE MONITORING DE LA LLC ET LE DIAGNOSTIC PRECOCE DE LA TRANSFORMATION EN SYNDROME DE RICHTER	89
5.4.1.	<i>Etude BLINART (BLINAtumomab after R-CHOP debulking therapy for patients with Richter Transformation).</i>	90
5.4.2.	<i>Première étude ancillaire à l'étude BLINART : monitoring de l'ADN tumoral circulant.</i>	92
5.4.3.	<i>Deuxième étude ancillaire à l'étude BLINART Étude de l'évolution tumorale de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en syndrome de Richter (SR).....</i>	92
5.5.	PROJET A MOYEN ET A LONG TERME : GENOMIQUE INTEGRATIVE DES SYNDROMES MYELOYDYSPLASIQUES PURS ET MIXTES MYELOPROLIFERATIFS / MYELOYDYSPLASIQUES.....	93
5.5.1.	<i>Étude génomique des ARS-T triples-négatives (JAK2, MPL, et CALR non-mutées).</i>	93
5.5.2.	<i>Étude méthylome/transcriptome des SMD avec excès de blastes traités par agents déméthylants.</i>	98
6.	RESPONSABILITÉS – CONTRATS.....	105
6.1.	BOURSES D'ÉTUDES	105
6.2.	FINANCEMENTS DE PROJETS DE RECHERCHE	105
6.3.	DEMANDES EN COURS	105
6.4.	APPARTENANCE A DES RESEAUX DE RECHERCHE DISPOSANT D'UN BUDGET PROPRE	105
7.	COLLABORATIONS.....	106
7.1.	COLLABORATIONS LOCALES, REGIONALES ET NATIONALES	106
7.2.	COLLABORATIONS INTERNATIONALES.....	107

Dr Julien BROSÉUS

8.1.1. Critères CNU (juillet 2019)	108
8.1.2. Enseignement (Cf document SIAPS)	110
8.1.3. Publications	110
8.1.4. Mobilité internationale	110
9. ANNEXES	111
9.1. PUBLICATIONS (5 MAJEURES).....	111
9.2. PUBLICATIONS D'ENCADREMENT DE M2 OU DE THESE.....	111
10. BIBLIOGRAPHIE	112

Liste des Figures

Figure 1. Poster présenté lors des 5èmes Etats Généraux de la Formation et de la Recherche Médicales en février 2020 à Caen	26
Figure 2. Effets de l'activation permanente de l'activité kinase de JAK2 sur les voies de signalisation dépendantes de JAK2. D'après Levine et al.	35
Figure 3. Panorama mutationnel des SMP BCR-ABL négatifs.	36
Figure 4. Mécanismes physiopathologiques induits par les mutants de CALR dans les SMP. D'après Cazzola et al.	37
Figure 5. Syndromes myéloprolifératifs, syndromes myélodysplasiques et syndromes mixtes myélodysplasiques/myéloprolifératifs. D'après Mughal et al.	39
Figure 6. Physiopathologie des SMP/SMD. D'après Mughal et al.	40
Figure 7. Caractéristiques moléculaires des syndromes mixtes myélodysplasiques/myéloprolifératifs. D'après Mughal et al.	42
Figure 8. Programme de la formation d'encadrant de Thèse d'Université des 13 et 14 juin 2019	52
Figure 9. Attestation de présence à la formation d'encadrant de Thèse d'Université.....	53
Figure 10. Attestation de mobilité post-doctorale.....	55
Figure 11. Projet d'étude génétique-génomique des lymphomes B-diffus à Grandes Cellules.....	60
Figure 12. Principes généraux concernant les lymphomes à petites cellules (exemple : la Leucémie Lymphoïde Chronique) et les lymphomes à grandes cellules (exemple : les lymphomes B-diffus à Grandes Cellules). La transformation d'un lymphome à petites cellules en un lymphome à grandes cellules constitue une évolution péjorative fréquente. D'après Küppers et al.	63
Figure 13. Les déterminants de la transformation de la LLC en SR. D'après Parikh et al.	70
Figure 14. Présentation du projet de recherche des déterminants de la transformation de la LLC en Syndrome de Richter.....	72
Figure 15. Représentation globale du projet CGPSR (Caractérisation Génomique et Protéomique du Syndrome de Richter, porté par le CHRU de Nancy, sous l'égide du groupe FILO et en partenariat avec l'Unité Inserm U1256. Les différents partenaires académiques, Français Allemands et Américains sont représenté pour chaque volet du projet. D'après Vogel et al.....	75
Figure 16. Présentation du volet d'étude du méthylome du Syndrome de Richter.....	77

Dr Julien BROSEUS

Figure 17. Présentation du volet d'étude transcriptomique du Syndrome de Richter. Analyse transcriptomique comparative des LBDGC primitifs et du Syndrome de Richter.	79
Figure 18. Mise en évidence de protéines associées de manière significative et récurrente à la résistance thérapeutique. D'après Gholami et al.....	80
Figure 19. Description des 4 groupes comparés dans le volet protéomique du Syndrome de Richter.	81
Figure 20. Classification hiérarchique des 191 protéines dont l'expression est significativement différentielle (False Discovery Rate < 0.05) entre le Syndrome de Richter (n=21) et les LBDGC primitifs (n=28) avec leurs principales annotations fonctionnelles et le réseau d'interaction protéine-protéine reconstitué in silico à partir des données publiques disponibles.	85
Figure 21. Survie globale (a) de la cohorte complète, survie globale en fonction (b) de l'ECOG PS, (c) de la numération plaquettaire, (d) de l'existence d'une anomalie de TP53, et (e) du status mutationnel IgHV. Ces paramètres sont évalués au diagnostic de Syndrome de Richter.	88
Figure 22. Construction de l'étude BLINART.....	91
Figure 23. Projet de recherche SMP/SMD-T-SC avec perspectives actuelles : quels sont les déterminants de la thrombocytose dans les SMP/SMD-T-SC JAK2, MPL et CALR non mutés ?	95
Figure 24. Caractériser les SMP/SMD-T-SC SF3B1 mutées, JAK2WT, MPLWT et CALRWT afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de la prolifération de la lignée mégacaryocytaire.	95
Figure 25. Premiers résultats de l'analyse de l'exome de 6 ARS-T triple négatives.	97
Figure 26. Présentation du projet MYRAGE (Myélodysplasies de haut Risque sous Azacytidine, Génétique et Épигénétique).	101
Figure 27. Présentation du parcours sur les 10 ans passés et du projet scientifique pour les 10 ans à venir, incluant les thématiques d'expertise, les partenariats scientifiques et les sources de financement.	103
Figure 28. Présentation du parcours sur les 10 ans passés et du projet scientifique pour les 10 ans à venir, incluant les thématiques d'expertise, les partenariats scientifiques, les encadrements d'étudiants et les publications acceptées, soumises et en préparation.....	104
Figure 29. Attestation de validation de la Mobilité Internationale en accord avec les prérequis de la sous-section 47-01 du CNU.	110

Liste des Tableaux

Tableau 1. Répartition des points SIGAPS sur les 10 années écoulées.	21
Tableau 2. Enseignements universitaires sur les 7 dernières années.....	23
Tableau 3. Enseignements hospitaliers sur les 8 dernières années.....	24
Tableau 4. Productivité des sujets d'examens sur SIDES sur les 6 dernières années.	27
Tableau 5. Production de cours sous forme de podcasts à l'intention des étudiants de 2ème cycle.....	29
Tableau 6. Points SIAPS, représentant les activités d'enseignement et les formations et actions pédagogiques sur les 10 dernières années.	31
Tableau 7. Critères diagnostiques de la TE. D'après Arber et al.....	38
Tableau 8. Syndromes mixtes myéloprolifératifs / myélodysplasiques.	39
Tableau 9. Liste des étudiants encadrés en SIR (Stage d'Initiation à la Recherche).	44
Tableau 10. Liste des étudiants encadrés en Master, avec valorisation scientifique.....	44
Tableau 11. Liste des étudiants encadrés en Thèse, avec valorisation scientifique.	45
Tableau 12. Liste des jurys auxquels le candidat a participé	47
Tableau 13. Liste des membres de l'équipe 3 de l'unité Inserm U1256 (contrat quinquennal 2018-2023).....	59
Tableau 14. Paramètres associés à la survie globale dans le Syndrome de Richter, déterminés par analyse multivariée.	87
Tableau 15. Stratégies thérapeutiques évaluée dans le cadre du Syndrome de Richter.	90
Tableau 16. Collaborations locales, régionales et nationales.....	107
Tableau 17. Collaborations internationales.....	107

Abréviations

ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
AMIP	Aspects Moléculaires et Intégrés de la Physiopathologie
AO	Appel d'Offre
ARS	Anémie Réfractaire Sidéroblastique
ARS-T	Anémie Réfractaire Sidéroblastique avec Thrombocytose
BC2T	Biochimies, Cellules, Cibles Thérapeutiques
BCR-ABL1	<i>Breakpoint Cluster Region-Abelson</i>
BioSE	Biologie Santé Environnement
BIMNS	BioIngénierie Médicament NanoSanté
BSIS	BioSciences et Ingénierie de la Santé
ctDNA	<i>Circulating Tumoral DNA</i>
CALR	Calreticulin
CAPP-Seq	<i>Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing</i>
CHRU	Centre Hospitalier Régional et Universitaire
CGPSR	Caractérisation Génomique et Protéomique du Syndrome de Richter
CNV	<i>Copy Number Variations</i>
CORAL	<i>Collaborative Trial on Relapsed Agressive Lymphoma</i>
CPP	Comité de Protection des Personnes
CRB	Centre de Ressources Biologiques
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
DES	Diplôme d'Études Spécialisées
DESC	Diplôme d'Études Spécialisées Complémentaires
DFGSO	Diplôme de Formation Générale en Sciences Odontologiques
DIU	Diplôme Inter-Universitaire
DMR	<i>Differentially Methylated Regions</i>
DNMT3a	DNA Methyltransferase 3 alpha
DP	Dossier Progressif
DR	Directeur de Recherche
DU	Diplôme Universitaire
ECNi	Examen Classant National Informatisé
EFS	Établissement Français du Sang
EH	Étudiant Hospitalier
EPO	Érythropoïétine
ETP	Équivalent Temps Plein

Dr Julien BROSEUS

FASM	Formation Approfondie en Sciences Médicales
FILO	<i>French Innovative Leukemia Organization</i>
FIM	<i>French Intergroup of Myeloproliferative disorders</i>
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin Embedded</i>
FGSM	Formation générale en Sciences Médicales
FILO	<i>French Innovative Leukemia Organization</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FST	Formation Spécialisée Transversale
GCLLSG	<i>German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group</i>
H2GI	Hématologie Biologique, HLA, Génétique, Immunologie
ICGC	<i>International Cancer Genome Consortium</i>
IE	Ingénieur d'Études
IGBMC	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
IgHV	<i>Immunoglobulin Heavy Variable</i>
IPHC	Institut Plurithématique Hubert CURIEN
Inserm	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IUT	Institut Universitaire de Technologie
JAK2	Janus Kinase 2
LBDGC	Lymphome B-Diffus à Grandes Cellules
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LMMC	Leucémie Myélo-Monocytaire Chronique
LMMJ	Leucémie Myélo-Monocytaire Juvénile
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCU-PH	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier
MFP	Myélofibrose Primitive
MPL	<i>Myeloproliferative Leukemia</i>
MSBM	Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales
MYRAGE	Myélodysplasies de haut Risque, étude Génétique et Épigenétique
N-GERE	Nutrition – Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux
QI	Question Isolée
QRM	Question à Réponses Multiples
PH	Praticien Hospitalier
PI3K	<i>Phosphatidyl Inositol 3 Kinase</i>
PU-PH	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
QRM	Question à Réponses Multiples
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicine, Oncovin, Prednisone

Dr Julien BROSEUS

RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RGHL	Régulation Génique dans l'Hématopoïèse et la Leucémogénèse
SIAPS	Score Individuel d'Aptitude Pédagogique en Santé
SF3B1	<i>Splicing Factor 3b Subunit 1</i>
SHB	Service d'Hématologie Biologique
SIDES	Système Informatique Distribué d'Évaluation en Santé
SMD	Syndrome Myélodysplasique
SMP	Syndrome Myéloprolifératif
SMP/SMD	Syndrome mixtes Myéloprolifératif/Myélodysplasique
SMP/SMD-T-SC	Syndromes mixtes myéloprolifératifs/Myélodysplasiques avec Thrombocytose et Sidéroblastes en Couronne
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SR	Syndrome de Richter
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TCEO	Troisième Cycle des Études Odontologiques
TE	Thrombocytémie Essentielle
TET2	<i>Tet Methylcytosine Dioxygenase 2</i>
TPO	Thrombopoïétine
UE	Unité d'Enseignement
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WAL-KU	Waldenström-Ku70

1. CURRICULUM VITAE

1.1. Informations générales

Nom, titres académiques : Julien BROSEUS, Doctorat en Médecine, Doctorat d'Université en Sciences de la Vie

Date et lieu de naissance : 20.02.1980; Villerupt, France

Nationalité : Française

Adresse professionnelle : Service d'Hématologie Biologique, CHRU de Nancy, site de Brabois, Rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Téléphone : +33 (0) 6 24 74 05 15 (personnel)
+33 (0) 3 83 15 49 14 (hôpital)

Fax : +33 (0) 3 83 15 37 89

E-mail : j.broseus@chru-nancy.fr
julien.broseus@univ-lorraine.fr

Statut actuel : Maître de Conférences des Universités–Praticien Hospitalier
CNU 47-01 Hématologie - Transfusion.
Université de Lorraine, Faculté de Médecine,
Inserm U1256 Nutrition, Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux.
Chef du Service d'Hématologie Biologique
CHRU de Nancy

Dr Julien BROSEUS

1.2. Diplômes et Titres Universitaires

Thèse d'Université (09/2016)	Ecole Doctorale Biologie, Santé, Environnement (BioSE), Université de Lorraine. Unité Inserm U954 N-GERE, Faculté de Médecine de Nancy : Sujet : « Approche Génomique dans les syndromes myéloprolifératifs et les lymphomes B diffus à grandes cellules en rechute ». Directeur de Thèse : Dr Rémi HOULGATTE (DR Inserm). Co-directrice de Thèse : Pr Catherine THIEBLEMONT
DU Assurance Qualité (2016-17)	Université de Lorraine. Faculté de Pharmacie de Nancy. Sujet : « La prestation de conseil au service d'Hématologie Biologique du CHRU de Nancy ». Directeurs : Dr Sylvain SALIGNAC, Dr Patricia FRANCK
DIU Pédagogie Médicale (2015)	Facultés de Médecine de Nancy et de Strasbourg. Sujet : « Mise en place d'une action pédagogique visant à préparer les étudiants de FASM2 aux ECNi par la conception de dossiers progressifs ». Directeur : Pr Marc BRAUN
DU Cytologie Hématologique (2013)	Université de Franche-Comté – Faculté de Médecine.
Doctorat d'État de Médecine (2012)	Université de Bourgogne – Faculté de Médecine. Sujet : l'Anémie Réfractaire Sidéroblastique avec Thrombocytose (ARS-T) est-elle une entité indépendante ? ». Directeur de Thèse : Pr François GIRODON.
Diplôme d'Etudes Spécialisées (2012)	Biologie Médical-Spécialité Hématologie. Université de Bourgogne.
Master 2 Recherche (2011)	Université Paris Diderot – Unité Inserm U866 « Biochimie, Cellules, Cibles Thérapeutiques » (BC2T). Spécialité « Génome et Différenciation Cellulaire. Parcours « Biologie moléculaire et fonctionnelle de l'Hématopoïèse ». Sujet : « Etude fonctionnelle du complexe MOZ-MLL-Symplekin dans la régulation du niveau d'expression du gène <i>HOXA9</i> » Directeur : Pr Jean-Noël BASTIE
DIU d'Anglais Médical (2009)	Université de Bourgogne
Master 1 (2008)	Certificats de MSBM « Traceurs, explorations fonctionnelles et métaboliques » (2002) ; « Physiologie et biologie des systèmes intégrés » (2003) ; « Immunologie et mécanismes physiopathologiques » (2008).
Examen National Classant (2007)	Classement : 1927 ^{ème} . Choix : Biologie Médicale Dijon
Concours de PCEM1 (2001)	Classement : 20 ^{ème} . Choix : Études de Médecine.
Baccalauréat général (1998)	Section S option Mathématiques. Mention Assez Bien

Dr Julien BROSEUS

1.3. Formation pratique hospitalière

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, CHRU de Nancy

Depuis le 1^{er} septembre 2016 Pôle Laboratoires (Pr JONVEAUX puis Dr FRANCK)
 Service d'Hématologie Biologique (Dr DEVIGNES puis Dr BROSEUS).

Assistant Hospitalo-universitaire Service d'Hématologie Biologique, CHRU de Nancy

Novembre 2012-Septembre 2016 Pôle Laboratoires (Pr JONVEAUX)
 Service d'Hématologie Biologique (Dr DEVIGNES).

DESC d'Hématologie Biologique (Pr FEUILLARD)

Septembre 2011 Morphologie de la cellule lymphoïde (Dr TRIMOREAU, Pr FEUILLARD). CHRU de Limoges.

Novembre 2011 Biologie des leucémies aiguës myéloïdes (Pr DELABESSE, Pr RECHER). CHRU de Toulouse.

Février 2012 Leucémies aiguës lymphoblastiques (Dr CAYUELA). CHRU Paris Saint-Louis

Janvier 2013 Syndromes myélodysplasiques (Dr TRIMOREAU, Pr FEUILLARD). CHRU de Limoges.

Juin 2013 Techniques cytogénétiques et moléculaires en hématologie (Pr PREUDHOMME). CHRU de Lille.

Octobre 2013 Myélome multiple (Pr AVET-LOISEAU). CHRU de Toulouse

Interne des Hôpitaux de Dijon Filière Biologie Médicale (2007-2012)

DES de Biologie Médicale – Niveau 1

Novembre 2007 - Avril 2008 Laboratoire d'Hématologie, Professeur MAYNADIÉ.

Mai 2008 - Octobre 2008 Laboratoire de Biochimie, Professeur GAMBERT.

Novembre 2008 - Avril 2009 Laboratoire de Bactériologie, Professeur NEUWIRTH.

Mai 2009 - Octobre 2009 Laboratoire d'Immunologie, Docteur OLSSON.

DES de Biologie Médicale – Niveau 2 - Spécialisation Hématologie (Pr MAYNADIÉ)

Novembre 2009 - Avril 2010 Laboratoire d'Hématologie, Professeur MAYNADIÉ.

Mai 2010 - Octobre 2010 Laboratoire de Génétique Moléculaire, Professeur TEYSSIER.

Novembre 2010 - Octobre 2011 Année-Recherche, Inserm U866, Professeur BASTIÉ.

Novembre 2011 - Avril 2012 Hématologie Clinique, Dr CAILLOT.

Mai 2012 - Octobre 2012 Laboratoire d'Hématologie - EFS Besançon, Dr SCHILLINGER.

Externe des Hôpitaux de Nancy (2003-2007)

Dr Julien BROSEUS

1.4. Formation par la recherche académique

Post-doctorat (2017-2018)

Clinique universitaire d'Ulm (Bade-Wurtemberg, Allemagne). Laboratoire du service de Médecine Interne III (Directeur : Professeur Hartmut DOHNER).

Unité de recherche sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) et le syndrome de Richter (Responsable : Professeur Stephan STILGENBAUER).

Thèmes traités : « Approche génomique de l'évolution clonale spontanée dans les LLC de faible risque » et « Étude du méthylome du Syndrome de Richter par analyse comparative avec le méthylome des différents syndromes lymphoprolifératifs B et des cellules lymphocytaires B normales ». (Financement par une bourse mobilité de l'Association des Chefs de Service du CHRU de Nancy, par une bourse du Cancéropôle Est et par une bourse de l'Association SILLC).

Techniques utilisées : extraction d'ADN et d'ARN à partir de tissus tumoraux fixés en FFPE (Formalin-Fixed Paraffin Embedded) par le protocole « Covaris truXTRAC total NA extraction kit® ». Purification (kits de purification QIAGEN) et quantification des ADN et des ARN (protocole QuBit® ThermoFisher Scientific). Séquençage de plus de 1000 échantillons par méthode Illumina TSCA (TruSeq Custom Amplicon). Formation à la technique de séquençage par la méthode de capture Nimblegen (Collaboration avec le docteur Davide ROSSI à Bellinzona, Suisse).

Thèse d'Université (2012-2016)

Université de Lorraine. École Doctorale BioSE (Biologie Santé Environnement ; Directeur : Professeur Patrick MENU).

Unité Inserm U954. Faculté de Médecine de Nancy (Directeur : Professeur Jean-Louis GUÉANT).

Équipe : « Bioinformatique et Génomique Intégrative » (Responsable : Dr Rémi HOULGATTE, DR Inserm).

Thème traité : « Approche génomique des syndromes myéloprolifératifs et des lymphomes B-diffus à grandes cellules en rechute (Financement par un poste d'Assistant Hospitalo-Universitaire).

Techniques utilisées : extraction d'ADN et d'ARN ; puces à ADN/microarray (collaboration avec la plateforme de Génomique de l'unité Inserm de Nantes) destinées (i) à l'analyse des SNP et CNV (Affymetrix SNP 6.0®) et (ii) à l'analyse du transcriptome (Agilent Whole Human Genome Microarray 4x44K) ; analyse des données de génomique (normalisation, K-means, classification hiérarchique, annotations fonctionnelles).

Master 2. Année-recherche (2010-2011)

Université Paris Diderot. M2 « Biochimie, Cellules, Cibles Thérapeutiques » (BC2T). Spécialité « Génome et Différenciation Cellulaire. Parcours « Biologie moléculaire et fonctionnelle de l'Hématopoïèse ».

Stage : unité Inserm U866. Faculté de Médecine de Dijon (Directeur : Professeur Éric SOLARY).

Équipe : RGHL « Régulation Génique dans l'Hématopoïèse et la Leucémogénèse » (Responsable : Dr Laurent DELVA ; DR Inserm).

Thème traité : « Étude fonctionnelle du complexe MOZ-MLL-Symplekin dans la régulation du niveau d'expression du gène HOXA9 ». Directeur : Pr Jean-Noël BASTIE (Financement par l'année-recherche).

Techniques utilisées : culture cellulaire (lignée KG1a) ; ARN interférence ; extraction d'ADN, d'ARN et de protéines ; PCR ; RT-qPCR ; Co-immunoprécipitation ; ChIP-PCR ; Western Blot.

Dr Julien BROSEUS

Master 1. Université de Bourgogne (2008)

Certificats de Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales (2002-2008)

- « Traceurs, explorations fonctionnelles et métaboliques » (2002)
- « Physiologie et biologie des systèmes intégrés » (2003)
- « Immunologie et mécanismes physiopathologiques » (2008).

Dr Julien BROSEUS

1.5. Publications

Publications principales (IF > 5)

1. **Broséus J**, Mourah S, Ramstein G, Bernard S, Mounier N, Cuccuini W, et al. VEGF₁₂₁ is predictor for survival in activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma and is related to an immune response gene signature conserved in cancers. *Oncotarget*. **2017**; 8(53):90808-90824. (IF 5,16)
2. **Broséus J**, Chen G, Hergalant S, Ramstein G, Mounier N, Guéant JL et al. Relapsed diffuse large B-cell lymphoma present different genomic profiles between early and late relapses. *Oncotarget*. **2016**; 7(51):83987-84002. (IF 5,16)
3. **Broséus J**, Park JH, Carillo S, Hermouet S and Girodon F. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. *Blood*. **2014**; 124(26): 3964-6. (IF 10,45)
4. **Broséus J**, Alpermann T, Wulfert M, Florensa Brichs L, Jeromin S, Lippert E, et al. MPN and MPN-r EuroNet (COST Action BM0902). Age, JAK2^{V617F} and SF3B1 mutations are the main predicting factors for survival in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*. **2013**; 27(9): 1826-1831. (IF 9,37)
5. **Broséus J**, Florensa L, Zipperer E, Schnittger S, Malcovati L, Richebourg S, et al. Clinical features and course of refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*. **2012**; 97(7): 1036-41. (IF 5,93)

Autres publications

6. Muller M, **Broséus J**, Feugier P, Thieblemont C, Beaugerie L, Arnone D, Ndiaye NC, Kokten T, Houlgatte R, Peyrin-Biroulet L. Characteristics of lymphoma patients with inflammatory bowel disease: A systematic review. *J Crohns Colitis*. **2020**. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa193.
7. Divoux M, Plocque A, Sevin M, Voillat L, Guerci-Bresler A, Girodon F and **Broséus J**. Efficacy of Lenalidomide in Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms with Ring Sideroblasts and an extreme platelet count. *Clin Case Rep*. **2020**; 8(9):1774-1780.
8. Lesesve JF, Thomas B, **Broséus J**, Bain BJ. Macropolycytes: Severe stress time for neutrophils. *Morphologie*. **2020**. S1286-0115(20)30042-4.
9. Manenq C, Lesesve JF, Dreumont N, Massin F, Salignac S, Mansuy L, Chastagner P, Latger-Cannard V, **Broséus J**. Combined use of multiparametric flow cytometry and cytomorphology to enhance detection of neuroblastoma metastatic cells in bone marrow. *Int J Lab Hematol*. **2020**; 42:52-60.
10. Humbert C, Gérard D, Rech F, Gauchotte G, **Broséus J**, Lesesve JF. Metastatic glioblastoma cells in brain biopsy rinse fluid. *Cytopathology*. **2020**; 31(2):167-168. doi: 10.1111/cyt.12775.
11. Filliatre-Clement L, **Broséus J**, Muller M, Hosseini K, Rotonda C, Schirmer L, et al. Serum Albumin or Body Mass Index: which prognostic factor for survival in patients with Acute Myeloblastic Leukaemia? *Hematol Oncol*. **2019**; 37(1):80-84
12. Franczak C, Filhine-Tressarieu P, **Broséus J**, Gilson P, Merlin JL, Harlé A. Clinical Interest of Circulating Tumor DNA in Oncology. *Arch Med Res*. **2018**; 49(5):297-305.

Dr Julien BROSEUS

13. D'Aveni-Piney M, Divoux M, Busby-Venner H, Muller M, **Broséus J**, Feugier P. Idelalisib in a patient with refractory Waldenström's macroglobulinemia complicated by anuric renal failure: a case report. *J Med Case Rep.* **2018**; 12(1):164.
14. Lesesve JF, **Broséus J**. Dysplastic neutrophils in the bone marrow of a Shwachman-Diamond syndrome patient. *Blood.* **2017**; 130(1):96.
15. **Broséus J**, Roth-Guépin G, D'Aveni-Piney M, Perrot A, Lesesve JF, Perrin J. An usual cause of elliptocytosis. *Ann Biol Clin (Paris).* **2016**; 74(6):704-707.
16. Lesesve JF, **Broséus J**. Confusing Hairy Cells in a Case of IgG Kappa Plasma Cell Leukemia. *Clin Lab.* **2016**; 62(4):749-50.
17. Filliatre L, **Broséus J**, Pissard S, Mekki C, Feugier P, Perrin J. Amyl nitrite inhalation, a "volatile" anemia. *Am J Hematol.* **2016**; 91(4):448.
18. Chen G, **Broséus J***, Hergalant S*, Donnart A, Chevalier C, Bolaños-Jiménez F et al. Identification of master genes involved in liver key functions through transcriptomics and epigenomics of methyl donor deficiency in rat: Relevance to nonalcoholic liver disease. *Mol Nutr Food Res.* **2015**; 59(2):293-302.
19. **Broséus J**, Lippert E, Klampfl T, Jeromin S, Zipperer E, Florensa L et al. Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia* **2014**; 28: 1374-6.
20. Largeot A, Pagetti J, **Broséus J**, Aucagne R, Lagrange B, Martin RZ *et al.* Symplekin, a polyadenylation factor, prevents MOZ and MLL activity on HOXA9 in hematopoietic cells. *Biochim Biophys Acta* **2013**; 1833(12): 3054-3063.
21. **Broséus J**, Visomblain B, Guy J, Maynadié M and Girodon F. Evaluation of mean sphered corpuscular volume for predicting hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hematol* **2010**; 32(5): 519-23.
22. Girodon F, Dutrillaux F, **Broséus J**, Mounier M, Goussot V, Bardonneau P *et al.* Leukocytosis is associated with poor survival but not with increased risk of thrombocytosis in essential thrombocythemia: a population-based study of 311 patients. *Leukemia* **2010**; 24: 900-903.

Soumises

23. Augé H, Notarantonio AB, Morizot R, Quinquenel A, Fornecker LM, Hergalant S, Feugier P and **Broséus J**. Genomic landscape and microenvironment remodeling in Diffuse Large B-Cell histologic variant of Richter Syndrome. *Frontiers in Immunology. Review.* **Soumise en août 2020.**

En cours de soumission

24. Moulin C, Guillemin F, Remen T, Bouclet F, Augé H, Quinquenel A, Dartigeas C, Morizot R, Lomazzi S, Busby H, Hergalant S, Tausch E, Tomowiak C, Leblond V, Thieblemont C, Cymbalista F, Laribi K, Béné MC, Stilgenbauer S, Guièze R, Feugier P*, **Broséus J***. *Equal contribution. Clinico-Biological, Molecular and Prognostic Features of Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma-Variant of Richter Syndrome: a Multicenter Retrospective Study of the French Innovative Leukemia Organization. Article original. **Soumis à Haematologica le 24 août 2020.**
25. Moulinet T, Dor-Etienne A, Gérard D, Campidelli A, Pierre C, Pouget C, Lesesve JF, **Broséus J**. Polyclonal or monoclonal plasma cells dyscrasia: association between castleman disease and POEMS syndrome. Case report. **Soumis à l'American Journal of Hematology le 27 août 2020.**

Dr Julien BROSEUS

Présentations orales lors de congrès nationaux et internationaux

Moulin C, Morizot R, Remen T, Augé H, Bouclet F, Lomazzi S, Dartigeas C, Quinquenel A, Busby H, Tomowiak C, Leblond V, Thieblemont C, Cymbalista F, Béné MC, Guieze R, Feugier P*, **Broséus J***. Caractéristiques clinico-biologiques et évolution des patients présentant un syndrome de Richter : une étude multicentrique du groupe FILO. Journée des Jeunes Experts dans la leucémie - Toulouse - **2019**.

Morizot R, **Broséus J**, Hergalant S, Moulin C, Augé H, Cianferani S, Carapito C, Feugier P, Perrot A, Fornecker LM. Caractérisation protéomique du syndrome de Richter (SR). Journée des Jeunes Experts dans la leucémie - Toulouse - **2019**.

Broséus J, Stilgenbauer S, Feugier P: Exploration of methylation patterns in Richter Syndrome. First meeting of the collaborative research group on lymphoma within the Great Region University. Homburg, Allemagne, **2019**.

Manenq C, Lesesve JF, Dreumont N, Massin F, Salignac S, Mansuy L, Chastagner P, Latger-Cannard V and **Broséus J**. Évaluation de la détection des cellules métastatiques médullaires de neuroblastome par cytométrie en flux multiparamétrique. 2^{ème} journée Interrégionale Recherche et Pédiatrie. Strasbourg, **2016**.

Broséus J, Park JH, Nibourel O, Herbaux C, Sagot C, Vanstraelen G, Wemeau M, Lambert F, Girodon F. Identification de mutations du gène encodant la calréticuline dans de rares cas de polyglobulies de Vaquez sans mutation de *JAK2*. Congrès annuel de la Société Française d'Hématologie, Paris, **2015**.

Broséus J, Massin F, Mansuy L, Lesesve JFL, Guérin E, Trimoreau F, Michel D, Devignes J, Feuillard J, Chastagner P, Latger-Cannard V. Optimisation de la détection des cellules métastatiques médullaires de neuroblastome par cytométrie en flux multiparamétrique. Congrès annuel de la Société Française de cytométrie en Flux, Lille **2014**.

Broséus J. Anémie réfractaire sidéroblastique avec thrombocytose : nouvelle entité ? *Premières rencontres Grand-Est en hématologie*. Nancy, France **2013**.

Broséus J, Morineau N, Lodé L, Girodon F, Hermouet S. W515R mutation of exon 10 of *MPL* in two familial cases of isolated thrombocytosis. *COST second Myeloproliferative Neoplasms/Myeloproliferative Neoplasms-related congenital diseases - Euronet meeting*, Albufeira, Portugal **2010**.

Présentations sous forme de panneau affiché lors de congrès nationaux et internationaux.

Broséus J*, Martin M, Perrot A, Baumann C, Cioni A, Zuily S, Joly L, Feugier P, Braun M. Préparation des étudiants de deuxième cycle des Etudes Médicales aux ECNI par la conception encadrée de dossiers progressifs. 5^{èmes} Etats Généraux de la Formation et de la Recherche Médicales. Université de Caen Normandie. Caen, **2020**.

Moulin C, Morizot R, Remen T, Augé H, Bouclet F, Lomazzi S, Dartigeas C, Quinquenel A, Busby H, Tomowiak C, Leblond V, Thieblemont C, Cymbalista F, Béné MC, Guieze R, **Broséus J***, Feugier P*. Clinical and Biological Characteristics and Outcomes of Richter Transformation: A French Multicenter Study from the Filo Group. Annual meeting of the American Society of Hematology, Orlando, **2019**.

Manenq C, **Broséus J**, Lesesve JF, Massin F, Devignes J, Mansuy L, et al. Evaluation de la détection des cellules métastatiques médullaires de neuroblastome par cytométrie en flux multiparamétrique. Congrès annuel de la Société Française d'Hématologie, Paris, **2016**.

Dr Julien BROSEUS

Broséus J, Hergalant S, Mounier N, Feugier P, Gisselbrecht C, Thieblemont C, Houlgatte R. Relapsed DLBCLs present frequent copy number variations of genes involved in lymphomagenesis with different pattern between early- and late-relapsed DLBCLs. International Conference on Malignant Lymphoma, Lugano, **2015**.

Girodon F, **Broséus J**, Park-Alexandre Ji-Hye, Hermouet Sylvie and Carillo Serge. Presence of Calreticulin Mutations in JAK2-Negative Polycythemia Vera. Annual meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, **2014**.

Girodon F, **Broséus J**, Lippert E, Jeromin S, Zipperer E, Florensa L et al. Low rate of CALR mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. EHA 19th annual congress, Milan, **2014**.

Broséus J, Lippert E et Girodon F. Les mutations de l'exon 9 de la *Calreticuline* sont rares dans les anémies réfractaires sidéroblastiques avec thrombocytose. Congrès annuel de la Société Française d'Hématologie, Paris, **2014**.

Schnittger S, Germing U, **Broséus J**, Grossmann V, Alpermann T, Florensa Brichs L *et al*. Analysis of *SF3B1* in a large cohort of Refractory Anemia with Ring Sideroblasts with/without Marked Thrombocytosis (RARS-T/RARS) in a European Multicenter Study. Annual meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, **2012**.

Broséus J, Lourdes F, Zipperer E, Schnittger S, Malcovati L, Mounier M, *et al*. Caractéristiques cliniques et évolution de l'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose dans une large cohorte de patients. Congrès annuel de la Société Française d'Hématologie, Paris, **2012**.

Girodon F, Dutrillaux F, **Broséus J**, Mounier M, Goussot V, Bardonneau P, *et al*. Leukocytosis is associated with poor survival but not with increased risk of thrombocytosis in essential thrombocythemia: a population-based study of 311 patients. *European School of Haematology international conference, myeloproliferative disorders*. Albufeira, Portugal **2010**.

Dr Julien BROSEUS

Points SIGAPS : 337 points au 30 octobre 2020

Journal	Rg	IF	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Points SIGAPS
Leukemia	A	8,96	3											16
Int J Lab Hematol	D	1,36	1											8
Haematologica	B	5,93			1									24
Biochim Biophys Acta	B	4,82				3								12
Leukemia	A	9,37				1								32
Leukemia	A	10,43					1							32
Blood	A	10,45					1							32
Mol Nutr Food Res	A	4,55						2						24
Ann Biol Clin (Paris)	E	0,22							1					8
Clinical Laboratory	E	0,84							D					8
Oncotarget	B	5,168							1					24
Am J Hematol	B	5,27							2					18
Blood	A	15,13								D				32
Oncotarget	NC	5,168								1				4
Arch Med Res	D	2,024									3			6
J Med Case Rep	E	0,59									AD			3
Cytopathology	E	1,376										AD		6
Hematol Oncol	C	3,193										2		12
Int J Lab Hematol	D	1,919											D	12
Morphologie	NC	-											AD	2
Clin Case Rep	NC	0,5											D	4
J Crohns Colitis	B	7,8											2	18
Total			22 publications										337	

Tableau 1. Répartition des points SIGAPS sur les 10 années écoulées.**AD : Avant-dernier auteur; D : dernier auteur.**

2. ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT

2.1. Activités d'enseignement Universitaire

Faculté de Médecine

1^{er} cycle UE Tissu Sanguin en FGSM3 (Pr FEUGIER)
UE Initiation à la Recherche Biomédicale (Pr GUÉANT)

2^{ème} cycle UE Hématologie en FASM2 (Pr FEUGIER)

3^{ème} cycle DES de Biologie Médicale (Pr SCHVOERER)

Master 1 Bases moléculaires des pathologies (Pr GUÉANT)
Approche moléculaire des hémopathies malignes (2h)

Faculté des Sciences

Master 1 Master Sciences du Vivant – Parcours Recherche en Biologie Santé
M1 Biochimie, Biologie Moléculaire et Régulations Cellulaires (BBMRC)
UE 810 : outils pour les analyses « omiques » (Dr MAZON)
Utilisation des outils « omiques » dans le contexte des hémopathies lymphoïdes B (4h)

Master 2 Aspects Moléculaires et Intégrés de la Physiopathologie (AMIP) (Pr LARTAUD)
Génomique des lymphomes et de la LLC (2h)
BioIngénierie Médicament NanoSanté (BIMNS): nutrigénomique (2h)
RBS : Master Sciences du Vivant parcours Recherche en Biologie Santé (Dr GRANDÉMANGE)
La leucémie lymphoïde chronique - modèle d'évolution tumorale et adaptation thérapeutique (3h).

Faculté d'Odontologie

1er cycle UE6 EC1 Hématologie en DFGSO2 (Dr BISSON)
Hématopoïèse, hémogramme (4h)

2ème cycle Module Hématologie en TCEO1
Pathologies de l'hémostase – Traitements anti-coagulants (2h)

Faculté de Pharmacie

Master 1 BioSciences et Ingénierie de la Santé et Sciences du Médicament (Pr BENSOUSSAN, Dr REPPEL)
Les cellules souches hématopoïétiques (2h)
UEL MTCT (Dr HARLÉ)
Hématologie et thérapies ciblées (2h)

Dr Julien BROSEUS

Master 2 Master Ingénierie de la Santé, parcours Bioingénierie, nanosanté, médicaments, Qualité (BNMQ) (Pr LENINGER-MULLER)

Caractérisation génomique des hémopathies lymphoïdes B (2h)

4^{ème} année UE "Marqueurs des pathologies issus des mécanismes moléculaires" (Dr DREUMONT)

Caractérisation génomique des hémopathies lymphoïdes B (2 h)

École de Maïeutique

5^{ème} année Pathologie hématologique et grossesse (2h) (Dr NADJAFIZADEH)

Institut Universitaire de Technologie (IUT) Nancy-Brabois

Licence Hématopoïèse. Pathologies onco-hématologiques (3h) (Dr LASALLE)

Faculté / Ecole	Cycle / Année	2013-2014	2014-2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018*	2018-2019*	2019-2020
Faculté de Médecine	1^{er} cycle	3,5h	4,5h	4h	10h	8h	0h	5h
	2^{ème} cycle	1h	1h	1h	8h	8h	0h	11h
	3^{ème} cycle	0h	6h	0h	6h	0h	0h	0h
	Master 1	0h	0h	0h	2h	0h	2h	2h
Faculté d'Odontologie	1^{er} cycle	4h	8h	4h	4h	0h	4h	4h
	3^{ème} cycle	0h	2h	0h	0h	0h	0h	0h
Faculté des Sciences	Master 1	0h	0h	0h	0h	0h	4h	4h
	Master 2	0h	0h	0h	4h	2h	0h	3h
Faculté de Pharmacie	2^{ème} cycle	0h	0h	0h	2h	0h	1,5h	1,5h
	Master 1	2h	2h	2h	2h	2h	4h	3,5h
École de Maïeutique	5^{ème} année	0h	0h	0h	0h	2h	2h	2h
IUT	Licence pro	1,5h	3h	3h	3h	3h	3h	3h
Total		12h	26,5h	15h	41h	25h	20,5h	39h

Tableau 2. Enseignements universitaires sur les 7 dernières années.
Heures exprimées en heures de cours magistraux. * Mobilité du 30/10/2017 au 2/11/2018

2.2. Activité d'enseignement hospitalier

Service d'Hématologie Clinique et Médecine Interne

Étudiants Hospitaliers Préparation aux ECNi. Cycles de 3 mois.

Internes Bibliographie et présentation de cas cliniques.

Service d'Hématologie Biologique

Étudiants Hospitaliers Préparation aux ECNi. Hématologie cellulaire. Microscope.

Internes UE Initiation à la Recherche Biomédicale

Pôle Spécialités Médicales

Étudiants Hospitaliers Préparation aux ECNi

Pôle Laboratoires

Internes Formation aux gardes multidisciplinaires. Hématologie cellulaire.

		2012-2013	2013-2014	2014-2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018*	2018-2019*	2019-2020
Hématologie Clinique et Médecine Interne	EH	8h	12h	13h	14h	14h	2h	4h	4h
	Internes	0h	0h	3h	4,5h	2h	0h	2h	2h
Hématologie Biologique	Internes	14h	12h	12h	12h	12h	0h	4h	4h
Pôle Spécialités Médicales	EH	0h	0h	0h	2h	2h	2h	0h	0h
Pôle Laboratoires	Internes	0h	12h	12h	12h	10h	0h	4h	4h
Total		22h	36h	40h	44,5h	40h	4h	14h	14h

Tableau 3. Enseignements hospitaliers sur les 8 dernières années.
*Mobilité du 30/10/2017 au 2/11/2018. EH : Étudiants Hospitaliers.

2.3. Recherche en Pédagogie Médicale

DIU de Pédagogie Médicale

DIU de Pédagogie Médicale (Facultés de Médecine de Nancy et de Strasbourg) obtenu en octobre 2015, après soutenance d'un mémoire intitulé : « Action pédagogique visant la progression des étudiants nancéiens de FASM2 en Hématologie en encadrant leur conception de dossiers progressifs ». Ce travail a été réalisé conjointement avec le Dr Michèle MARTIN, sous la direction de Monsieur le Professeur Marc BRAUN, Doyen de la Faculté de Médecine de Nancy.

Contexte : L'examen classant national informatisé (ECNI) est composé de questions à réponses multiples (QRM), isolées ou organisées en dossiers progressifs (DP). Le bénéfice de la conception de DP par les étudiants hospitaliers (EH) dans l'optique de la préparation des ECNI n'a pas encore été exploré.

Buts : Proposer aux EH une démarche active visant à améliorer leur préparation aux ECNI par la conception encadrée de DP et créer une base de données d'entraînement destinée aux EH.

Sujets / matériel et méthodes : La conception encadrée de DP a été proposée à 310 EH de FASM2. Nous avons évalué l'impact de la conception encadrée de DP sur les résultats des EH : (i) sur un questionnaire conçu localement, (ii) aux examens universitaires de la discipline et (iii) aux ECNI.

Résultats : Les EH ayant conçu un ou plusieurs DP ont d'avantage progressé entre les deux sessions d'évaluation. Aux examens universitaires, les 88 EH ayant conçu au moins un DP ont eu une note significativement meilleure que ceux obtenus par les 217 étudiants n'en ayant pas conçu (15,30 Vs. 13,00; $p < 0,0001$). Aux ECNI, les étudiants ayant participé à l'ensemble de la démarche pédagogique ont obtenu un rang de classement médian significativement meilleur que le groupe complet (3415,5 Vs. 4723,5 ; $p = 9,8 \times 10^{-4}$), soit un gain de 1308 places.

Conclusion : Le bénéfice apporté aux étudiants pour la préparation aux ECNI, la forte participation pour une démarche optionnelle (40%) ainsi que la satisfaction exprimée nous incitent à poursuivre ce type de démarche.

Ce travail a été présenté sous forme de poster lors des 5^{èmes} Etats Généraux de la Formation et de la Recherche Médicales en février 2020 à Caen et a fait partie des 3 posters primés (Figure 1).

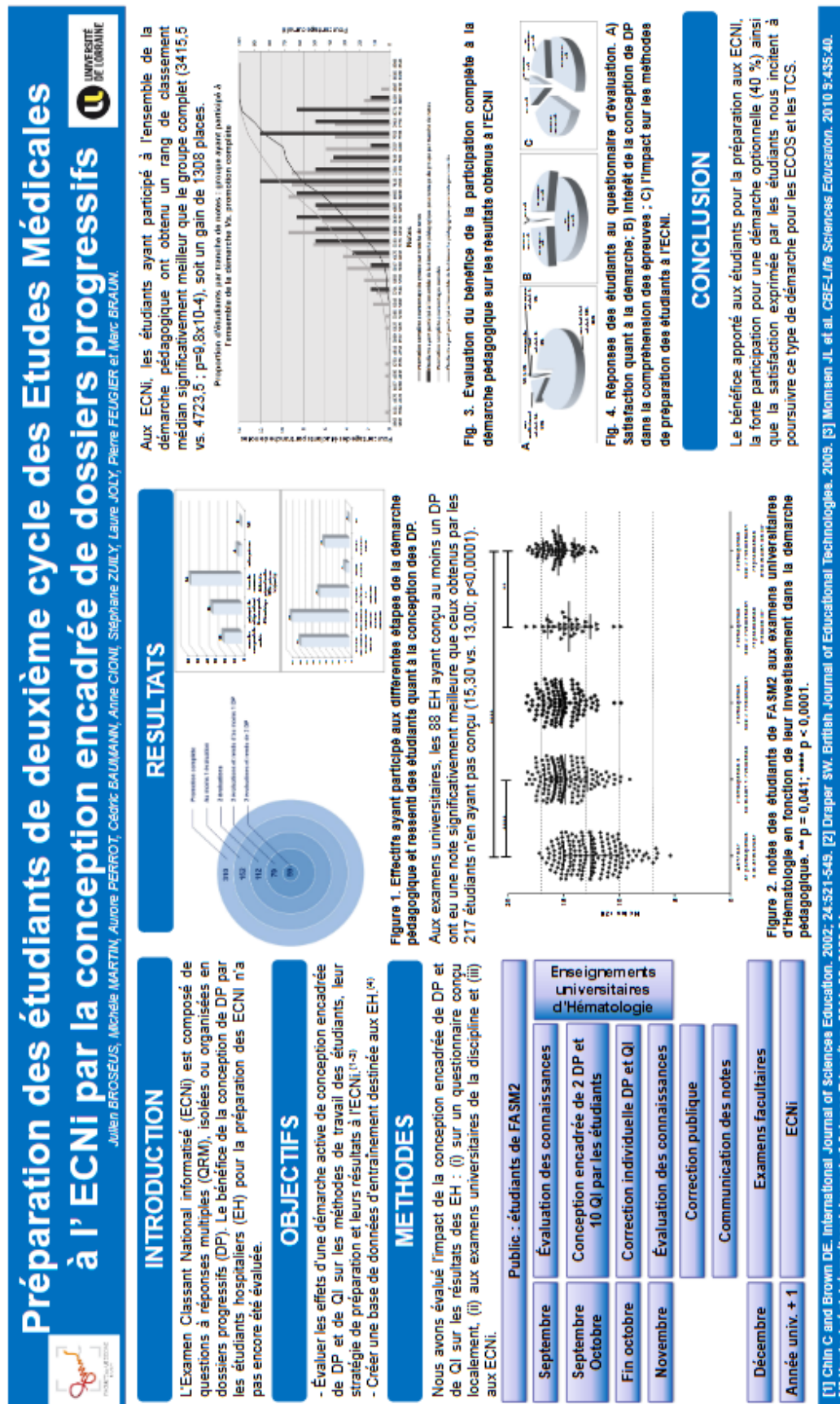


Figure 1. Poster présenté lors des 5^{èmes} Etats Généraux de la Formation et de la Recherche Médicales en février 2020 à Caen

2.4. Productivité SIDES

Organisation des examens SIDES (Système Informatique Distribué d'Évaluation en Santé) en FGSM3 (3^{ème} année), FASM2 (5^{ème} année), FASM3 (6^{ème} année), sous la responsabilité du Professeur Pierre FEUGIER (Tableau 4).

		2014-2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018*	2018-2019	2019-2020
FGSM3	DP	0	0	1	0	0	0
	QI	10 (S1)	6 (S1)	10 (S1) + 10 (S2)	13 (S1)	15 (S1)	0
FASM2	DP	2 (S1) + 2 (S2)	1 (S1)	2 (S1) + 1 (S2)	2 (S1)	1 (S1)	1 (S2)
	QI	4 (S1) + 4 (S2)	10 (S1)	6 (S1) + 6 (S2)	12 (S1)	0	15(S1)
FASM3	DP	0	1	1	1	1	
	QI	0	5	5	0	0	15
Concours blanc interrégional	DP	0	0	0	0	0	0
	QI	8	0	0	0	0	5
Total	DP	4	2	4	3	2	1
	QI	26	21	37	26	15	35

Tableau 4. Productivité des sujets d'examens sur SIDES sur les 6 dernières années.

DP : Dossier Progressif ; QI : Question isolée. S1 : Première Session ; S2 : Deuxième Session. FGSM : Formation Générale en Sciences Médicales ; FASM : Formation Approfondie en Sciences Médicales

2.5. Bureau de docimologie - Faculté de Médecine de Nancy

J'appartiens depuis la rentrée universitaire 2014-2015 au bureau de Docimologie de la Faculté de Médecine de Nancy. Ce bureau, constitué de membres hospitalo-universitaires de la Faculté est coordonné par le docteur Guillaume VOGIN (PU-PH en Oncologie). Il a pour but d'aider et d'assister les enseignants des différentes disciplines dans la création des examens, pour que ceux-ci répondent aux nouvelles exigences des ECNi. Nous organisons au moins deux séances de relecture hebdomadaire pour couvrir l'ensemble des examens de deuxième cycle.

A ce titre, j'organise et anime 6 à 7 séances par an, au cours desquels les sujets d'examens sont relus et mis en conformité avec les exigences des ECNi, ceci en amont des examens universitaires.

L'objectif est aussi de permettre aux étudiants de la Faculté de Médecine de Nancy de s'entraîner aux ECNi dans des conditions optimales (alimentation de la base locale SIDES).

Dr Julien BROSEUS

2.6. Commission Pédagogie Numérique

Membre de la commission Pédagogie numérique de la faculté de médecine depuis septembre 2015. Objectif : proposer des *podcasts* de 15 min sur tous les items ECNi. Ces podcasts sont accessibles sur le site internet de l'Université de Lorraine.

Cette commission est présidée par le Professeur Bruno CHENUUEL (PU-PH en Physiologie) et a pour vocation d'accompagner les enseignants de la faculté dans la conception de podcasts de 10-15 minutes, se concentrant sur les objectifs essentiels (de rang A) à connaître, ceci pour chaque item du programme. Ces vidéos sont tournées par les enseignants des différentes disciplines dans un studio professionnel (Studio Professeurs de l'Université de Lorraine, site Lorraine-Sud) et progressivement mises en ligne sur le site ARCHE de l'Université de Lorraine.

L'objectif était de couvrir l'ensemble du programme ECNi par ces *podcasts* dans un délai de 3 années universitaires (2016-2017, 2017-2018 et 2018-2019). L'Université de Lorraine a mis à disposition de ce projet, des professionnels du numérique qui ont travaillé sur le format podcast pour le rendre accessible à tout moment à partir d'un smartphone. Les étudiants peuvent donc consulter les podcasts à tout moment.

La commission a donc déterminé un cahier des charges concernant le contenu et l'organisation de ces *podcasts*, ainsi que leur répartition par spécialité. Pour chaque podcast tourné, 2 membres de la commission sont désignés comme rapporteurs, et vérifient la conformité de la vidéo avec le cahier des charges. Si le podcast est déclaré conforme, celui-ci est diffusé sur le site de l'Université de Lorraine. Chaque *podcast* doit être accompagné de 5 à 15 Questions Isolées, permettant de vérifier la bonne compréhension du cours.

Durant mon année de MCU-PH stagiaire, j'ai fait le choix de m'investir fortement sur ce projet pour la discipline Hématologie. Nous avons recensé 22 items relevant du programme d'Hématologie. Avec l'accord de Monsieur le Professeur Pierre FEUGIER, Référent Universitaire de la discipline Hématologie à Nancy, j'ai conçu les documents powerpoint servant de base aux *podcasts* pour 19 des 22 items. Tous les *podcasts* ont été tournés par un binôme d'enseignants de la discipline (le plus souvent 1 Hématologue Clinicien et 1 Hématologue Biologiste). J'ai participé au tournage de 19 des 22 items dévolus à la discipline (**Tableau 5**).

Il est à noter que la discipline Hématologie a été saluée comme étant de loin la plus active dans ce projet « Podcasts ECNi », dans la mesure où 100% des items ont été couverts par des podcasts dès l'année universitaire 2016-2017 (l'objectif pour chaque discipline étant de 33% par an sur 3 ans). Notre travail a d'autant plus été souligné, qu'il reposait pour l'essentiel sur 3 enseignants Hospitalo-Universitaires titulaires (Professeur Pierre FEUGIER, Docteur Aurore PERROT, Docteur Julien BROSEUS).

Ces podcasts servent aussi de base à l'enseignement aux étudiants hospitaliers, dans le service d'Hématologie et Médecine Interne (Professeur Pierre FEUGIER) et d'Hématologie Biologique (Docteur Julien BROSEUS). Il s'agit d'un programme d'enseignement trimestriel, fondé sur des cours d'une heure (1 cours par item ECNi), à raison de 2 à 3 cours par semaine. Le format de ces cours se compose de 15 minutes de rappel des éléments essentiels (à l'aide du support du *podcast*) puis 45 minutes de dossiers type ECNi.

Dr Julien BROSEUS

Item	Intitulé	Objectifs	Podcast
187	Fièvre chez un patient immunodéprimé	Connaître les situations d'urgence et les grands principes de la prise en charge. Connaître les principes de la prise en charge en cas de fièvre aiguë chez un patient neutropénique. Connaître les principes de prévention des infections chez les patients immunodéprimés.	JB/AP
198	Biothérapies et thérapies ciblées	Connaître les bases cellulaires et moléculaires des cellules souches embryonnaires et adultes, des cellules reprogrammées. Connaître les principes des thérapies cellulaires et géniques. Expliquer les principes d'évaluation des biothérapies. Connaître les bases cellulaires et tissulaires d'action des thérapies ciblées. Argumenter les principes de prescription et de surveillance.	AP/VD
208	Hémogramme chez l'adulte et l'enfant	Argumenter les principales indications de l'hémogramme, discuter l'interprétation des résultats et justifier la démarche diagnostique si nécessaire.	JB/CM
209	Anémie chez l'adulte et l'enfant	Argumenter les principales hypothèses diagnostiques et justifier les examens complémentaires pertinents. Argumenter l'attitude thérapeutique dans les anémies carencielles et planifier leur suivi.	JB/AP
210	Thrombopénie chez l'adulte et l'enfant	Argumenter les principales hypothèses diagnostiques et justifier les examens complémentaires pertinents.	JB/AP
211	Purpuras chez l'adulte et l'enfant	Argumenter les principales hypothèses diagnostiques et justifier les examens complémentaires pertinents.	JB/AP
212	Syndrome hémorragique d'origine hématologique	Diagnostiquer un syndrome hémorragique d'origine hématologique. Interprétation les examens courants d'hémostase.	MM/AP
213	Syndrome mononucléosique	Argumenter les principales hypothèses diagnostiques devant un syndrome mononucléosique et justifier les premiers examens complémentaires les plus pertinents.	JB/AP
214	Éosinophilie	Argumenter les principales hypothèses diagnostiques devant une hyperéosinophilie et demander les premiers examens complémentaires les plus pertinents.	JB/CM
215	Pathologie du fer chez l'adulte et l'enfant	Diagnostiquer une carence ou une surcharge en fer. Argumenter l'attitude thérapeutique et planifier le suivi du patient.	JB/AP
216	Adénopathie superficielle de l'adulte et de l'enfant	Devant une ou des adénopathies superficielles, argumenter les principales hypothèses diagnostiques et justifier les examens complémentaires pertinents.	JB/AP
217	Amylose	Diagnostiquer une amylose de type AA ou AL. Citer les principaux organes pouvant être impliqués dans le développement de l'amylose.	JB/AP
272	Splénomégalie	Argumenter les principales hypothèses diagnostiques devant une splénomégalie et demander les premiers examens complémentaires les plus pertinents.	JB/AP
293	Agranulocytose médicamenteuse : conduite à tenir	Diagnostiquer une agranulocytose médicamenteuse. Identifier les situations d'urgence et planifier leur prise en charge.	JB/AP
312	Leucémies aiguës	Diagnostiquer une leucémie aiguë (hors classification).	JB/AP
313	Syndromes myélodysplasiques	Diagnostiquer une myélodysplasie.	JB/MD
314	Syndromes myéloprolifératifs	Diagnostiquer une maladie de Vaquez, une thrombocytémie primitive, une leucémie myéloïde chronique.	JB/PF
315	Leucémie lymphoïde chronique	Diagnostiquer une leucémie lymphoïde chronique.	JB/PF
316	Lymphomes malins	Diagnostiquer un lymphome malin.	JB/PF
317	Myélome multiple	Diagnostiquer un myélome multiple des os. Démarche diagnostique en présence d'une gammopathie monoclonale.	JB/AP
325	Transfusion sanguine et produits dérivés du sang : indications, complications. Hémovigilance	Expliquer les risques transfusionnels, les règles de prévention, les principes de traçabilité et d'hémovigilance. Prescrire une transfusion des médicaments dérivés du sang. Appliquer les mesures immédiates en cas de transfusion mal tolérée.	JB/MD
326	Prescription et surveillance des antithrombotiques chez l'adulte et chez l'enfant.	Connaître pour chacune les mécanismes d'action de classe, les principes du bon usage, les critères de choix d'un médicament en première intention, les causes d'échec, les principaux effets indésirables et interactions	MM/AP

Tableau 5. Production de cours sous forme de podcasts à l'intention des étudiants de 2^{ème} cycle.
AP : Aurore Perrot ; CM : Christine Manenq ; JB : Julien Broséus ; MD : Maud D'Aveni ; MM : Michèle Martin ; PF : Pierre Feugier ; VD : Véronique Decot.

Dr Julien BROSEUS

2.7. Score SIAPS (Score Individuel d'Aptitude Pédagogique en Santé)

CHARGES D'ENSEIGNEMENT												
	2010 2011	2011 2012	2012 2013	2013 2014	2014 2015	2015 2016	2016 2017	2017 2018	2018 2019	2019 2020	Coefficient	TOTAL
PACES : nb d'heures de cours magistraux	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
MED2 à MED6 : nb d'heures de cours magistraux	0	0	1	8,5	15,5	9	22,5	16	4	22	1	98,5
PACES à MED6 : nb d'heures d'ED	0	0	0	0	0	0	1,5	0	1,5	1,5	1	4,5
PACES à MED6 : nb d'heures de TP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0
MED2 à MED6 : nb d'heures en centre de simulation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Conférences d'internat au sein de la Faculté de médecine : nombre de conférences	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
3° cycle et autres formations médicales (DES, DESC, DU, DIU) : nb d'heures de cours	0	0	0	6	6	0	6	0	10	0	1	28
Masters, thèses d'université : nb d'heures de cours	0	0	0	2	2	2	8	4	8	10,5	1	36,5
Formations paramédicales facultaires : nb d'heures de cours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Maïeutique : nb d'heures de cours	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0,5	3
Formations paramédicales extra-facultaires : nb d'heures de cours	0	0	0	1,5	3	3	3	3	3	3	0,5	9,75
Sous-total CHARGES D'ENSEIGNEMENT												180

FORMATION PEDAGOGIQUE												
	2010 2011	2011 2012	2012 2013	2013 2014	2014 2015	2015 2016	2016 2017	2017 2018	2018 2019	2019 2020	Coefficient	TOTAL
Possession d'un DU ou DIU de pédagogie, ou équivalent (1=oui)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	20	20
Nombre de journées de formation en pédagogie	0	0	0	0	2	1	2	0	1	2	1	5
Titulaire de la certification SIDES (1=oui)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	3
Sous-total FORMATION PEDAGOGIQUE												28

Dr Julien BROSEUS

ACTIVITÉS PÉDAGOGIQUES et SERVICES RENDUS												
	2010 2011	2011 2012	2012 2013	2013 2014	2014 2015	2015 2016	2016 2017	2017 2018	2018 2019	2019 2020	Coefficient	TOTAL
Production pédagogique numérique, TICE : nb d'heures de cours (hors mise à jour)	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	3	18
Publications en pédagogie ou didactique (nombre)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Participation à la rédaction d'un polycopié national ou livre (nombre, hors mise à jour)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
Participation à une commission pédagogique de la Faculté (nombre)	0	0	0	0	1	2	2	2	4	3	10	140
Rédaction de sujets d'examen de fin d'année (1 par dossier ou pour 15 QCM)	0	0	0	2	3	3	3	3	3	3	2	40
Responsabilité d'UE 1er ou 2ème cycle études médicales (1 par UE)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
Responsabilité d'autre UE (1 par UE)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Contributions ECNi validées (Faculté, SIDES) (1 par dossier ou pour 15 QRM)	0	0	0	0	11	12	12	12	12	6	2	130
Nombre de copies corrigées	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0
Sous-total ACTIVITÉS PÉDAGOGIQUES et SERVICES RENDUS												328

Score SIAPS ACTIVITÉS**536.25**

Tableau 6. Points SIAPS, représentant les activités d'enseignement et les formations et actions pédagogiques sur les 10 dernières années.

3. RESPONSABILITÉS ET MANDATS ÉLECTIFS

3.1. Responsabilités Hospitalières

Chef du Service d'Hématologie Biologique (depuis mars 2019)

Adjoint du Chef du Service d'Hématologie Biologique (depuis janvier 2017)

Suppléant du Référent Recherche du pôle Laboratoires (depuis octobre 2016)

3.2. Responsabilités en Recherche

Représentant des rangs B au Conseil de Laboratoire de l'Unité Inserm U1256 (mandat janvier 2018 à janvier 2023).

Membre élu du conseil Scientifique de la Direction de la Recherche et de l'Innovation du CHRU de Nancy (depuis janvier 2019).

Investigateur principal de deux protocoles de Recherche portées par le CHRU de Nancy (CGPSR et MYRAGE)

3.3. Responsabilités Universitaires

Président délégué à la Faculté de Médecine de Nancy pour les ECNi (année universitaire 2020-2021)

Pilote de la Formation Spécialisée Transversale (FST) Hématologie clinique (janvier 2019)

Assesseur SIDES de la Faculté de Médecine de Nancy (décembre 2018)

Commission locale de coordination du DES d'Hématologie Clinique (novembre 2018)

Membre depuis la rentrée universitaire 2018/2019

Chargé de Mission : Docimologie (décembre 2017)

Conseil de Gestion de la Faculté de Médecine (novembre 2017)

Élu au Conseil d'Administration de la Faculté de Médecine : collègue B, pour un mandat de 4 ans.

Commission locale de coordination du DES de Biologie Médicale (septembre 2017)

Membre depuis la rentrée universitaire 2017/2018

Commission Pédagogie numérique de la faculté de médecine (septembre 2015)

Membre depuis la rentrée universitaire 2015/2016.

Bureau de Docimologie de la Faculté de Médecine de Nancy (septembre 2014)

Membre depuis la rentrée universitaire 2014/2015.

3.4. Participation à des groupes collaborateurs

Membre du groupe FILO (*French Innovative Leukemia Organization*) depuis 2016.

Membre de la Société Française d'Hématologie depuis 2013.

Membre du Groupe Français d'Hématologie Cellulaire depuis 2013.

Membre du FIM (*French Intergroup of Myeloproliferative disorders*) depuis 2012.

Membre du groupe COST-MPN (*European Cooperation in Science and Technology- Myeloproliferative Neoplasms*) depuis 2010.

4. ACTIVITÉS DE RECHERCHE

4.1. Internat de Biologie Médicale et Master II Recherche

J'ai réalisé mon internat de Biologie Médicale (Spécialité Hématologie Biologique – Professeur Marc MAYNADIÉ) au CHU de Dijon (2007-2012), incluant un Master II recherche (Université Paris Diderot). Au cours de cette période, j'ai pu réaliser des travaux de recherche :

- sur les syndromes myéloprolifératifs et les syndromes mixtes myéloprolifératifs/myélodysplasiques, dans le cadre de mon internat et de ma thèse d'exercice, sous la direction du Professeur François GIRODON (PU-PH dans le service d'Hématologie biologique du CHU de Dijon).
- sur la dérégulation de l'expression génique dans les leucémies aiguës myéloblastiques, dans le cadre de mon Master II recherche (stage réalisé à l'unité Inserm U866 à Dijon), sous la direction du Professeur Jean-Noël BASTIE (PU-PH dans le service d'Hématologie Clinique du CHU de Dijon) et du Docteur Laurent DELVA (DR Inserm)

4.2. Assistanat en Hématologie Biologique et Thèse d'Université (2012-2016)

Arrivée à Nancy en novembre 2012, pour exercer la fonction d'Assistant Hospitalo-Universitaire dans le service d'Hématologie Biologique. Le profil de ce poste inclut un mi-temps universitaire, que j'ai utilisé pour réaliser mes travaux de Thèse d'Université dans l'unité Inserm U954 N-GERE (Nutrition Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux), dirigée par le Professeur Jean-Louis GUÉANT.

Cette unité étudie les conséquences d'un défaut d'apport en donneurs de méthyles (vitamines B12 et B9) ou d'un défaut de leur métabolisme. Ces conséquences sont envisagées selon 4 axes (contrat quinquennal 2012-2017) :

- la prolifération, la différenciation et la plasticité cérébrale.
- le rôle épigénétique et épigénomique de ces vitamines durant la vie fœtale avec leurs conséquences sur les maladies métaboliques à l'âge adulte.
- le rôle de ces vitamines dans l'inflammation et le stress cellulaire, en particulier dans le domaine des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.
- le rôle des anomalies du transport et du métabolisme de ces vitamines dans la déficience intellectuelle.

Nous avons été intégrés à cette unité en cours de contrat, en 2012, pour construire un groupe de recherche autour de l'arrivée du Docteur Rémi HOULGATTE (DR Inserm) sur la génomique intégrative des hémopathies malignes (notamment les néoplasies du lymphocyte B).

Au sein de l'unité Inserm U954, j'ai pu réaliser mes travaux de Thèse sur la génomique des hémopathies malignes, au sein d'un groupe nouvellement formé, comprenant : le Docteur Rémi HOULGATTE (DR Inserm, Directeur de Thèse), le Professeur Pierre FEUGIER (PU-PH, Référent Universitaire de la discipline Hématologie à Nancy), le Docteur Aurore PERROT (MCU-PH en Hématologie Clinique), Gaïli CHEN (Doctorante) et Sébastien HERGALANT (Ingénieur Inserm).

Notre thématique de recherche est centrée sur la génomique des hémopathies lymphoïdes B matures : lymphomes B-diffus à Grandes Cellules (LBDGC), Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC), lymphome de la zone marginale, maladie de Waldenström.

Dr Julien BROSEUS

Mes travaux de Thèse ont été réalisés en collaboration avec le Professeur Catherine THIEBLEMONT (PU-PH en Hématologie à l'Hôpital Saint-Louis, Co-directrice de Thèse).

4.2.1. Étude génomique des syndromes myéloprolifératifs et des syndromes mixtes myéloprolifératifs/myélodysplasiques.

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP)

Les SMP constituent un ensemble d'hémopathies malignes chroniques acquises et clonales affectant la cellule souche hématopoïétique (CSH). Ils sont caractérisés par l'hyperplasie d'une ou plusieurs lignées myéloïdes, constituée de cellules matures, sans blocage de maturation et sans avortement intra-médullaire. D'après les données du Registre des Hémopathies Malignes de Côte d'Or (période 1980-2004) et celles du Registre de Basse-Normandie (période 1997-2004), les SMP représentent entre 11,6 et 12% des hémopathies malignes. Leur incidence en Côte d'Or est de 3,2 nouveaux cas pour 100 000 habitants et par an. La médiane de survie des SMP est de 91,7 mois.⁽¹⁾

Ces pathologies sont caractérisées par une moelle de cellularité augmentée avec une maturation hématopoïétique complète, conduisant à une augmentation du nombre de cellules circulantes (granulocytes, érythrocytes et/ou plaquettes). Cliniquement, ces hyperplasies des lignées myéloïdes se traduisent par un syndrome tumoral, avec une splénomégalie et/ou une hépatomégalie, un syndrome d'hyperviscosité et un risque accru de complications thrombotiques ou hémorragiques. Ces pathologies présentent un risque d'évolution vers l'insuffisance médullaire par myélofibrose secondaire, et/ou vers la leucémie aiguë myéloblastique (LAM).⁽²⁾

Liste des syndromes myéloprolifératifs (SMP) : D'après Arber et al.⁽³⁾

SYNDROMES MYÉLOPROLIFÉRATIFS
Leucémie myéloïde chronique, <i>BCR-ABL1</i> positive Leucémie neutrophile chronique Maladie de Vaquez Myélofibrose primitive Thrombocytémie essentielle Leucémie éosinophile chronique, sans spécification Mastocytose Syndromes myéloprolifératifs inclassables

Compte-tenu de leur plus forte incidence, la leucémie myéloïde chronique (LMC), la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP) constituent les 4 principaux SMP.

La physiopathologie des SMP s'explique par des anomalies clonales touchant des gènes codant pour des protéines à activité tyrosine kinase. Ces mutations conduisent à une activation constitutive de ces protéines et des voies de transduction qu'elles gouvernent, entraînant une prolifération cellulaire anormale. TE, PV et MFP sont caractérisées par une forte proportion de mutations affectant le gène JAK2 (Janus Kinase 2).

Dr Julien BROSEUS

Rôle de JAK2 dans la myélopoïèse

La protéine JAK2 est une protéine à activité tyrosine kinase associée à plusieurs récepteurs cytokiniques de classe I dont plusieurs sont essentiels dans la myélopoïèse, en particulier le récepteur à l'érythropoïétine (EPO) et le récepteur à la thrombopoïétine (TPO). Le récepteur à l'EPO est un homodimère dont la partie cytoplasmique est phosphorylée par la tyrosine kinase JAK2 en présence du ligand, l'EPO. La transduction du signal passe par la phosphorylation croisée de résidus tyrosine des deux protéines JAK2 associées au récepteur. Ceci permet ensuite l'activation du facteur de transcription STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), des voies MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et PI3K (*Phosphatidyl Inositol 3 Kinase*) et donc à la prolifération des cellules hématopoïétiques (**Figure 2**). JAK2 possède un domaine inhibiteur qui interrompt la mise en jeu de la voie d'activation dès lors que le ligand est détaché du récepteur.

La mutation du gène *JAK2*, situé au niveau du bras court du chromosome 9 (9p24), exerce un rôle majeur dans la physiopathologie des SMP *BCR-ABL1* négatifs.⁽⁴⁻⁷⁾ La plus fréquente de ces mutations, est une substitution d'une guanine par une thymine au sein de l'exon 14 du gène menant au remplacement d'une valine par une phénylalanine en position 617 de la protéine : *JAK2*^{V617F}. Cette mutation conduit à la synthèse d'un récepteur JAK2 dont le domaine inactivateur JH2 est non fonctionnel. Ceci entraîne une hypersensibilité aux cytokines activatrices, une activation constitutive de JAK2 et une mise en jeu prolongée de plusieurs voies de signalisation de récepteurs aux cytokines, dont le récepteur à l'EPO et le récepteur à la TPO, menant à la prolifération des lignées myéloïdes.

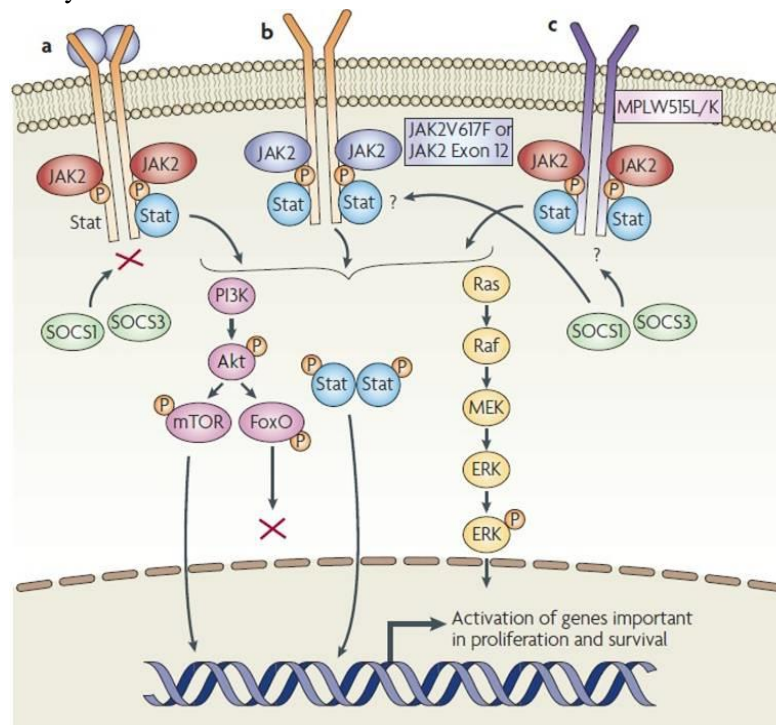


Figure 2. Effets de l'activation permanente de l'activité kinase de JAK2 sur les voies de signalisation dépendantes de JAK2. D'après Levine et al.

Dr Julien BROSEUS

Mutations récurrentes dans les SMP *BCR-ABL* négatifs

La mutation *JAK2*^{V617F} est retrouvée chez 95 à 97% des patients atteints de PV, 60% des patients atteints de MFP et 60% des patients atteints de TE. Chez 1 à 2% patients atteints de la maladie de Vaquez *JAK2*^{V617F} négatifs, une mutation activatrice de *JAK2* peut être retrouvée au niveau de l'exon 12, avec des conséquences fonctionnelles équivalentes à celle de la mutation *JAK2*^{V617F}. La mutation *JAK2*^{V617F} n'est pas spécifique d'un SMP particulier, de même que son absence n'exclut pas le diagnostic de SMP. De telles mutations ont d'ailleurs été décrites dans des cas de syndromes mixtes myéloprolifératifs/myélodysplasiques (SMP/SMD), en particulier l'Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes en couronne et Thrombocytose (ARS-T).⁽⁸⁻¹⁶⁾

Plusieurs mutations activatrices du gène *MPL* (MyéloProliférative Leukemia), codant pour le récepteur de la TPO (*MPL*^{W515L} ou *MPL*^{W515K}) peuvent être retrouvées dans 3 à 5% des cas de TE et 5 à 10% des cas de MFP.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

Les mutations de *CALR* ont été découvertes dans 67 à 71% des TE et 56 à 88% des MFP *JAK2* et *MPL* non-mutées (**Figure 3**). Ces mutations ont été décrites comme mutuellement exclusives. Désormais, plus de 90% des TE et des MFP sont associées à un marqueur clonal expliquant le caractère myéloprolifératif : *JAK2*^{V617F}, mutations de *MPL* et mutations de *CALR*. Aucune mutation de *CALR* n'a été retrouvée dans la PV.^(20, 21)

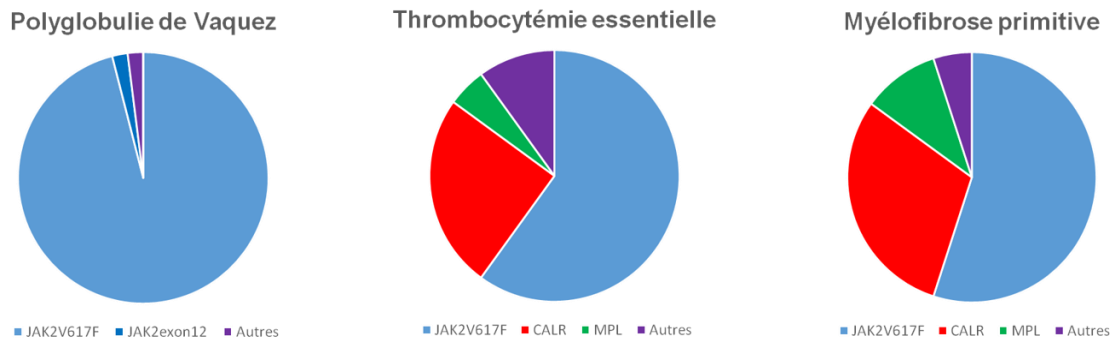


Figure 3. Panorama mutationnel des SMP BCR-ABL négatifs.

La calréticuline est une protéine résidant dans la lumière du réticulum endoplasmique et agissant comme une protéine chaperonne pour de nombreuses glycoprotéines, permettant leur compaction. Par ailleurs, le domaine C-terminal de la protéine participe à la régulation de l'homéostasie calcique et donc la signalisation cellulaire. Plus de 50 types de mutations de *CALR* ont été décrites. Il s'agit d'insertions ou de délétions situées dans l'exon 9 du gène, responsables d'un décalage du cadre de lecture. Plus de 80% de ces mutations sont des délétions de 52 paires de bases (type 1) ou des insertions de 5 paires de bases (type 2). Les mutations de *CALR*, *JAK2* et *MPL* ont été décrites comme mutuellement exclusives. Ainsi, il existe désormais un marqueur de clonalité dans près 90% des TE et des MFP.^(20, 21)

Sur le plan phénotypique, l'utilisation de souris irradiées à doses létales et transplantées avec de la moelle osseuse infectée par un rétrovirus exprimant *CALR*^{mut} montre que les mutants de type 1 (del 52pb) sont responsables d'un tableau de thrombocytose marquée et d'une progression rapide vers un tableau de MFP, alors que les mutants de type 2 (ins 5pb) sont responsables d'une TE stable.⁽²²⁾ Les mutants de *CALR* activent constitutivement la voie JAK-STAT par le biais de *MPL*, le récepteur à la TPO, induisant une expansion de la lignée mégacaryocytaire.⁽²³⁻²⁵⁾

Dr Julien BROSEUS

Sur le plan physiopathologique, (i) il existerait au sein de l'appareil de Golgi une interaction anormalement stable entre la calréticuline mutante et MPL, puis (ii) le récepteur MPL exprimé à la surface de la CSH reste couplé à la calréticuline mutante, (iii) MPL est activé indépendamment de la présence de TPO, ce qui a pour effet la dimérisation puis l'activation de JAK2. La survie et la croissance des CSH dépendent de la TPO. Au stade de précurseur hématopoïétique, seuls les mégacaryocytes demeurent sensibles à la TPO. L'expression d'une protéine calréticuline mutante a pour conséquence une expansion clonale MPL-induite des CSH, la production excessive de plaquettes par les mégacaryocytes puis une fibrose médullaire (**Figure 4**).⁽²³⁻²⁶⁾

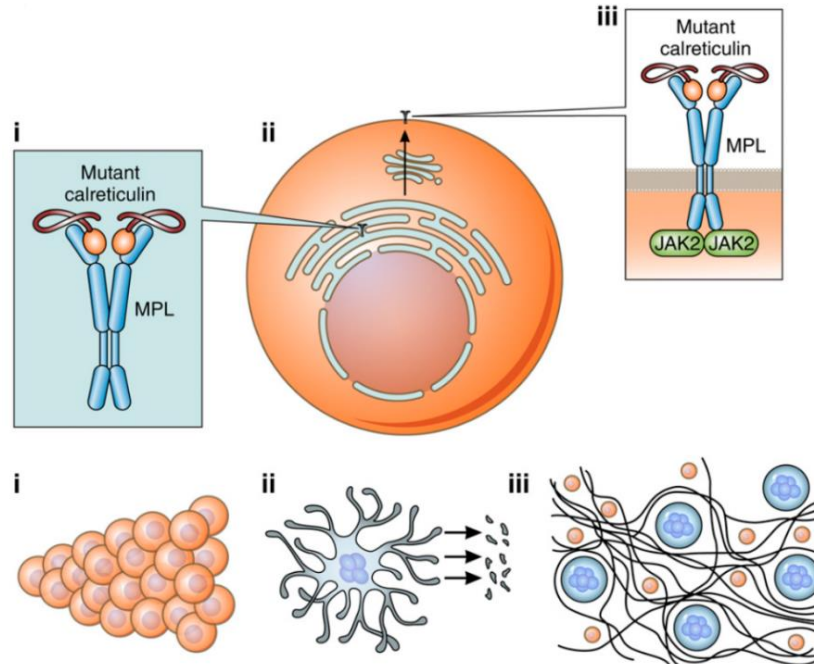


Figure 4. Mécanismes physiopathologiques induits par les mutants de CALR dans les SMP. D'après Cazzola et al.

La thrombocytemie essentielle

La TE est le plus fréquent des SMP et implique de manière prépondérante la lignée mégacaryocytaire. Elle est caractérisée par une thrombocytose ($> 450 \times 10^9$ plaquettes/L) avec anisocytose plaquettaire, micromégacaryocytes circulants, un nombre augmenté de mégacaryocytes géants, dysmorphiques (noyaux hyperlobés en « bois de cerfs »), une hyperleucocytose modérée avec une discrète myélémie et des épisodes de thrombose et/ou d'hémorragie. Le réseau réticulinique est normal ou seulement légèrement augmenté. Les autres causes de thrombocytose doivent être exclues (autre SMP, syndrome inflammatoire, carence en fer). Les critères diagnostiques de la TE sont listés dans le **Tableau 7**.⁽³⁾

CRITÈRES DIAGNOSTIQUES DE LA TE
<p>Critères majeurs</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Numération plaquettaire > 450 x 10⁹/L 2. Biopsie ostéomédullaire montrant une prolifération touchant principalement la lignée mégacaryocytaire avec un nombre augmenté de grands mégacaryocytes matures au noyau hyperlobé. Pas d'augmentation significative de la proportion ni d'anomalie de maturation des précurseurs granuleux ou érythroblastiques. Fibrose réticulinique éventuelle, rare et mineure (grade 1). 3. Absence des critères diagnostiques de la maladie de Vaquez, de la myélofibrose primitive, de la leucémie myéloïde chronique <i>BCR-ABL1</i> positive, d'un syndrome myélodysplasique ou d'une autre néoplasie myéloïde. 4. Présence de mutations de <i>JAK2</i>, <i>MPL</i>, ou <i>CALR</i>. <p>Critère mineur</p> <p>Présence d'un marqueur de clonalité, ou absence d'élément en faveur d'une thrombocytose réactionnelle.</p> <p>Le diagnostic de TE requiert les 4 critères majeurs, ou les 3 premiers critères majeurs et le critère mineur.</p>

Tableau 7. Critères diagnostiques de la TE. D'après Arber et al.

Au sein des SMP, la TE a l'incidence la plus élevée avec 1,2 nouveau cas pour 100 000 habitants et par an).

⁽¹⁾ La TE est une maladie indolente caractérisée par de longs intervalles de survie sans événement interrompus par des événements thrombo-emboliques veineux et artériels liés à la thrombocytose et à des anomalies fonctionnelles plaquettaires, ainsi que par des événements hémorragiques liés à une thrombopathie. Après un certain nombre d'années, la TE peut se compliquer d'une myélofibrose. L'évolution de la TE en LAM est rare (< 5% des patients). L'espérance de vie des patients atteints de TE est proche de la normale dans la plupart des cas (médiane de survie de 129 mois).⁽²⁷⁾

Les syndromes mixtes myéloprolifératifs/myélodysplasiques

Il s'agit de maladies clonales de la CSH qui, au moment du diagnostic, présentent à la fois des caractéristiques des syndromes myéloprolifératifs et des caractéristiques des syndromes myélodysplasiques (**Tableau 8 ; Figures 5 et 6**).^(28, 29) Ils représentent 9,8% des hémopathies myéloïdes, soit environ 3% des hémopathies malignes. Leur incidence est de 0,6 nouveau cas pour 100 000 habitants et par an et leur médiane de survie est de 26,6 mois.⁽¹⁾

Les SMP/SMD regroupent la leucémie myélo-monocytaire chronique (LMMC), la leucémie myéloïde chronique atypique *BCR-ABL1* négative, la leucémie myélo-monocytaire juvénile (LMMJ), les SMP/SMD inclassables et une entité longtemps considérée comme provisoire et désormais reconnue : l'ARS-T.^(3, 29)

SYNDROMES MIXTES MYELOPROLIFERATIFS / MYELOYDYSPLASIQUES
Leucémie myélo-monocytaire chronique
Leucémie myéloïde chronique atypique <i>BCR-ABL1</i> négative
Leucémie myélo-monocytaire juvénile
Syndromes myéloprolifératifs/myélodysplasiques inclassables
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose

Tableau 8. Syndromes mixtes myéloprolifératifs / myélodysplasiques.

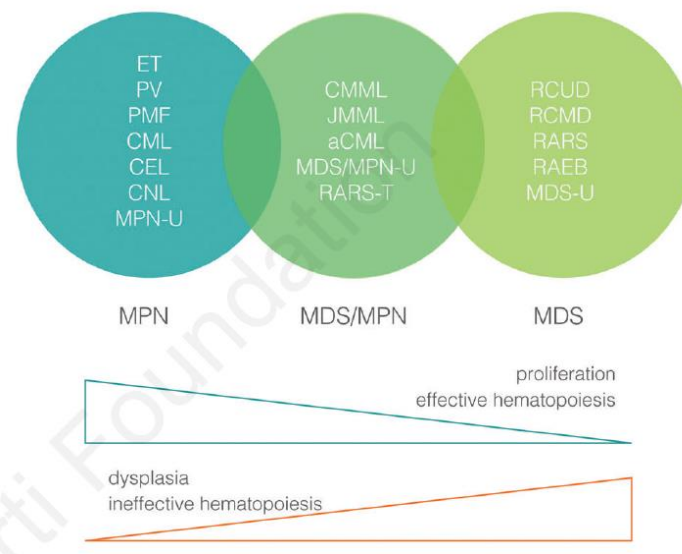


Figure 5. Syndromes myéloprolifératifs, syndromes myélodysplasiques et syndromes mixtes myélodysplasiques/myéloprolifératifs. D'après Mughal et al.

MPN : Myeloproliferative Neoplasms ; ET : Essential Thrombocythemia ; PV : Polycythemia Vera ; PMF : Primary MyeloFibrosis ; CML : Chronic Myeloid Leukemia ; CEL : Chronic Eosinophilic Leukemia ; CNL : Chronic Neutrophilic Leukemia ; MPN-U : Myeloproliferative Neoplasms Unclassified. MDS/MPN : MyeloDysplastic Syndromes/Myeloproliferative Neoplasms ; CMML : Chronic Myelo-Monocytic Leukemia ; JMML : Juvenile Myelo-Monocytic Leukemia ; aCML : atypic Chronic Myeloid Leukemia ; MDS/MPN-U : MyeloDysplastic Syndromes/Myeloproliferative Neoplasms Unclassified ; RARS-T : Refractory Anemia with Ring Sideroblasts and marked Thrombocytosis ; MDS : MyeloDysplastic Syndrom ; RCUD : Refractory Cytopenia with Unilineage Dysplasia ; RCMD : Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia ; RARS : Refractory Anemia with Ring Sideroblasts ; RAEB : Refractory Anemia with Excess Blasts ; MDS-U : MyeloDysplastic Syndroms-Unclassified.

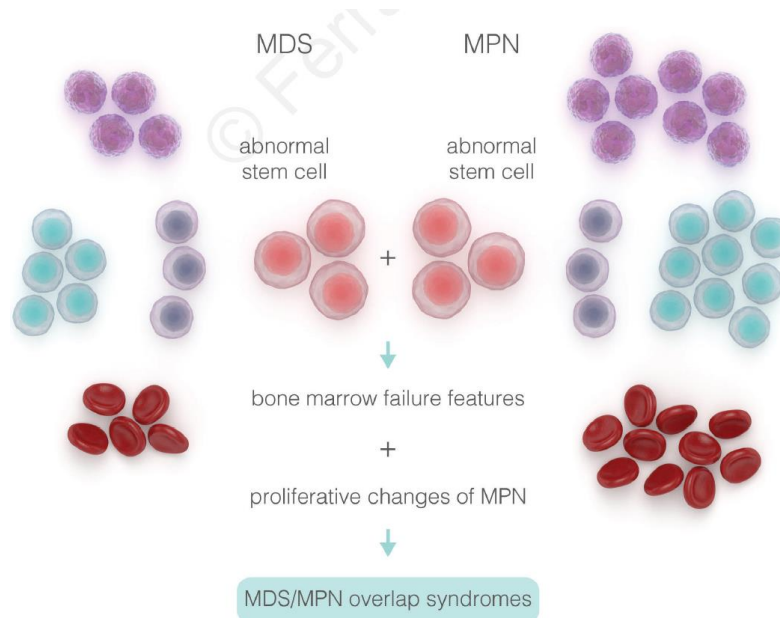


Figure 6. Physiopathologie des SMP/SMD. D'après Mughal et al.

L'Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose (ARS-T)

Dans la classification OMS 2001 des hémopathies malignes, l'ARS-T (appelée à l'époque thrombocytémie essentielle avec sidéroblastes en couronne) a été proposée comme entité provisoire pour regrouper tous les patients présentant des caractéristiques cliniques et cytologiques d'un syndrome myélodysplasique appelé Anémie Réfractaire Sidéroblastique (ARS), mais aussi une thrombocytose marquée associée à des anomalies mégacaryocytaires similaires à celles observées dans la TE.

En 2001, l'ARS-T était définie selon les critères suivants : (i) plaquettes $> 600 \times 10^9/L$, (ii) au moins 15% de sidéroblastes en couronne (SC), (iii) $< 5\%$ de blastes médullaires, (iv) prolifération de mégacaryocytes avec une morphologie caractéristique, (v) exclusion de la mutation *BCR-ABL1*, (vi) exclusion de l'inv (3)(q21;q26.2) et de la délétion 5q.

En 2005, Shaw décrit l'entité "sidéroblastes en couronne et thrombocytose", correspondant aux critères suivants : (i) thrombocytose $> 500 \times 10^9/L$ durant au moins 6 mois, (ii) $\geq 15\%$ de sidéroblastes en couronne, (iii) pas d'anomalie cytogénétique, (iv) élimination des autres causes de thrombocytose, (v) élimination des causes réversibles d'apparition des sidéroblastes en couronne, (vi) moins de 3% de blastes dans la moelle, (vii) moins de 1% de blastes sanguins.⁽³⁰⁾

Dans la classification OMS de 2008, l'ARS-T est considérée comme une entité provisoire et la question de son existence en tant qu'entité indépendante n'est pas résolue. Les critères diagnostiques de l'ARS-T sont modifiés : (i) anémie (hémoglobine $< 12,5$ g/dl chez la femme et $< 13,5$ g/dl chez l'homme), (ii) $< 5\%$ de cellules blastiques médullaires, (iii) dysérythropoïèse touchant au moins 10% des cellules érythroblastiques ; (iv) $\geq 15\%$ des érythroblastiques présentent l'aspect de SC ; (v) thrombocytose $> 450 \times 10^9/L$; (vi) prolifération de grands mégacaryocytes atypiques de morphologie similaire à ceux retrouvés dans les SMP *BCR-ABL1* négatifs ; (vii) exclusion de la mutation *BCR-ABL1* ; (viii) exclusion de l'inv (3)(q21;q26.2) et de la délétion 5q.

Dr Julien BROSEUS

La démonstration du statut moléculaire unique de l'ARS-T.

Au cours d'un premier travail multicentrique européen, réalisé entre 2010 et 2012, nous avons montré que cette entité peut prétendre au statut de pathologie indépendante compte-tenu de ses particularités biologiques, moléculaires et pronostiques. En particulier, la proportion de mutations *JAK2*^{V617F} est de 42,9% dans l'ARS-T, alors qu'elle est de moins de 5% dans l'ARS, et de 70% dans la TE.⁽³¹⁾

Notre hypothèse était que l'ARS-T est une entité indépendante, caractérisée sur le plan moléculaire par la co-occurrence d'une mutation donnant un avantage prolifératif et d'une mutation responsable du caractère dysplasique. Cette hypothèse s'est trouvée renforcée par la démonstration d'une forte proportion de mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'épissage alternatif, dans les SMD avec sidéoblastes en couronne, en particulier *SF3B1*. Ainsi, le gène *SF3B1* est muté dans 64 à 82,6% des ARS⁽³²⁻³⁴⁾ et 72% des ARS-T.⁽³⁵⁾ Ces mutations sont rares dans la TE (0-3%). L'ARS-T associerait donc une forte proportion de mutations *JAK2*^{V617F} et de mutations de *SF3B1*, confirmant son caractère indépendant de l'ARS et de la TE.⁽³⁶⁾

Grâce à un recrutement à l'échelle européenne, nous avons réuni 111 ARS-T et 33 ARS. Les mutations de *SF3B1* sont retrouvées dans 96/111 cas d'ARS-T (86,5%) et 28/33 (84,8%) ARS. La plupart des mutations de *SF3B1* se situent dans les exons 14 et 15 du gène. Cette étude confirme par ailleurs la forte proportion de mutations *JAK2*^{V617F} dans l'ARS-T (48,6%) et la faible fréquence de cette mutation dans les ARS (0%). La forte proportion de mutations de *SF3B1* dans l'ARS-T permet de démontrer que l'ARS-T est indépendante de la TE.⁽³⁷⁾

La démonstration d'une forte proportion de mutations de *CALR* dans les TE et les MFP *JAK2* non-mutées nous a amené à mener ce travail sur notre cohorte d'ARS-T. Ces mutations de *CALR* sont retrouvées dans 0 à 12,5% des ARS-T, mais les cohortes explorées étaient de petite taille (24 malades au maximum). Notre hypothèse est qu'il existe un fort taux de mutations de ce gène dans les ARS-T, expliquant le caractère myéloprolifératif dans les cas *JAK2* non-mutés. Nous avons réuni une cohorte de 95 ARS-T, réunissant tous les critères OMS. Les mutations de *SF3B1* et les mutations *JAK2*^{V617F} et *JAK2*^{exon12} ont été recherchées selon les méthodes précédemment décrites.⁽³⁷⁾ Les mutations de l'exon 9 de *CALR* ont été recherchées par analyse de fragments et séquençage selon Sanger, selon la méthode publiée,⁽²⁰⁾ 82,7% des ARS et 88,3% des ARS-T étaient porteuses d'une mutation de *SF3B1*. 49,4% des ARS-T étaient porteuses de la mutation *JAK2*^{V617F}. Aucune mutation de l'exon 12 de *JAK2* n'a été retrouvée. Enfin, seul une ARS-T portait la mutation *MPL*^{W515L} (sur 88 testées).

Par contre, seule une ARS-T portait une mutation de l'exon 9 de *CALR*. Il s'agissait d'une délétion de 10 paires de bases, responsable d'un décalage du cadre de lecture. Par ailleurs, cette ARS-T portait la mutation *JAK2*^{V617F} - avec une charge allélique de 4% - et une mutation de *SF3B1*.⁽³⁸⁾

Si l'existence d'une mutation de *CALR* permet d'expliquer la thrombocytose et la myélofibrose dans les TE et les MFP *JAK2* non-mutées, la très faible proportion de ces mutations dans l'ARS-T ne permet pas d'expliquer la thrombocytose dans les cas *JAK2* non-mutés.

Au final, l'ARS-T constitue une entité indépendante, caractérisée sur le plan moléculaire par une mutation de *SF3B1* dans près de 90% des cas (ce qui la distingue de la TE) et par une forte proportion de mutations de *JAK2* ou de *MPL* (ce qui la distingue de l'ARS) (**Figure 7**).⁽²⁸⁾

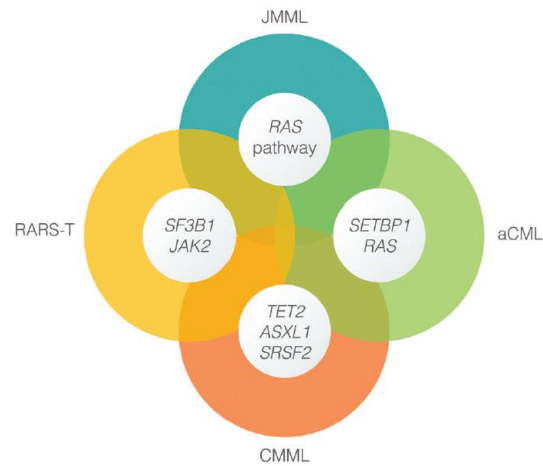


Figure 7. Caractéristiques moléculaires des syndromes mixtes myélodysplasiques/myéloprolifératifs. D'après Mughal et al.

Au cours de mes travaux de Thèse d'Exercice, réalisés à Dijon, nous avons montré que cette entité peut prétendre au statut de pathologie indépendante compte-tenu de ses particularités biologiques, moléculaires et pronostiques. En particulier, la proportion de mutations *JAK2*^{V617F} est de 42,9% dans l'ARS-T, alors qu'elle est de moins de 5% dans l'ARS, et de 70% dans la TE.⁽³¹⁾ Toutefois, la caractérisation moléculaire de l'ARS-T n'était pas définie de manière précise.

Concomitamment, il a été démontré que les ARS-T présentent fréquemment une mutation affectant *SF3B1*, un gène codant pour un acteur de l'épissage alternatif, mais cette proportion a été évaluée sur un petit nombre de cas.^(33, 35, 39) Enfin, des mutations se situant dans l'exon 9 du gène *CALR* ont été décrites dans plus de 2 tiers des cas de TE et de myélofibroses primitives ne présentant ni mutation de *JAK2* ni mutation de *MPL*.^(20, 21)

Au cours de mes années de Thèse d'Université, nous avons démontré :^(37, 40, 41)

- que les mutations de *SF3B1* sont très fréquentes (86,5%) dans les ARS-T et qu'elles portent une valeur pronostique.
- que les mutations de *CALR* sont rares dans les ARS-T, et peuvent être retrouvées de manière exceptionnelle dans les polyglobulies de Vaquez.
- que les ARS-T présentent un profil moléculaire spécifique, associant une anomalie responsable du caractère myéloprolifératif et une anomalie responsable du caractère myélodysplasique.

Pour autant, les déterminants moléculaires du versant myéloprolifératif des ARS-T ne sont pas totalement élucidés. En effet, environ 50% des ARS-T sont porteuses de la mutation *JAK2*^{V617F}, 1% sont porteuses de la mutation *MPL*^{W515L} et 1% sont porteuses d'une mutation de *CALR*. Ce qui signifie que près de 50% des ARS-T ne sont pas porteuses d'une mutation connue pour être responsable du caractère prolifératif. La problématique est la même pour les Syndromes Myéloprolifératifs (SMP) *JAK2*, *MPL* et *CALR* non-mutés, en particulier la TE et la myélofibrose primitive.

La suite du développement de ce projet est donc de chercher ces déterminants moléculaires de la thrombocytose, notamment par l'étude de l'exome et du méthylome des ARS-T triple-négatives.

4.2.2. Étude génomique des lymphomes B-Diffus à Grandes Cellules (LBDGC) en rechute

Près de 40% des patients atteints de LBDGC rechutent après le traitement de première ligne. Chez ces patients, le pronostic est réservé en raison de la faible efficacité des traitements de rattrapage.⁽⁴²⁻⁴⁵⁾ Les rechutes sont réparties équitablement entre rechutes précoces, c'est-à-dire se déclarant moins d'un an après la fin du traitement de première ligne, et rechutes tardives, c'est-à-dire se déclarant plus d'un an après la fin du traitement. Le pronostic est particulièrement sombre pour les patients en rechute précoce, avec une survie de 17% à 3 ans comparativement aux rechutes tardives qui ont une survie de 50% à 3 ans.⁽⁴³⁾ Sur le plan génomique, les LBDGC sont très bien caractérisés au diagnostic⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ mais peu étudiés à la rechute.⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾ Les anomalies du fonctionnement cellulaire déterminantes dans les LBDGC en rechute sont peu connues.

L'étude CORAL (*Collaborative Trial on Relapsed Aggressive Lymphoma*) a inclus 396 patients présentant un LBDGC en rechute et a permis de comparer les deux traitements de seconde ligne les plus répandus : le R-DHAP (Rituximab, Dexaméthasone, Haute dose de cytarabine, cisplatine) et le R-ICE (Rituximab, Ifosfamide, Carboplatine, Etoposide).⁽⁴⁴⁾ Pour 39 de ces patients (19 présentant une rechute précoce et 20 présentant une rechute tardive), une biopsie ganglionnaire a été analysée par puce Affymetrix SNP 6 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Ces puces à ADN présentent 1 800 000 sondes couvrant le génome humain (soit une distance moyenne de 1800 bases entre 2 sondes consécutives), permettant de détecter les *Copy Number Variations* (CNV) avec une grande précision. De plus, ces puces permettent d'explorer 906 600 *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP).

En comparant les CNV de chacun des deux groupes, nous avons pu identifier des anomalies récurrentes dans les rechutes précoces et dans les rechutes tardives, ceci en appliquant une méthode statistique originale dérivée du *Significance Analysis of Microarray*. Nous avons identifié deux signatures, correspondant respectivement aux rechutes précoces et aux rechutes tardives. La signature des rechutes précoces comprend des anomalies affectant le cycle cellulaire, l'apoptose et la transcription. Cette signature peut expliquer l'avantage sélectif conféré au clone malin, ainsi que sa chimiorésistance. Les résultats ont fait l'objet d'un panneau affiché au congrès 2015 de *l'International Conference on Malignant Lymphoma* à Lugano et ont été publiés sous la forme d'un article original.⁽⁵²⁾

Notre deuxième objectif était d'identifier des facteurs de mauvais pronostic dans les LBDGC en rechute. Une étude couplant le niveau d'expression de plusieurs membres de la famille VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) à l'analyse globale du transcriptome a permis de démontrer l'importance pronostique de l'expression de VEGF₁₂₁ dans les LBDGC de type ABC en rechute. Cet impact pronostique est associé à une signature transcriptomique en lien avec la réponse immune.⁽⁵³⁾

4.3. Encadrement d'étudiants (2015-2021)

4.3.1. Stages d'Initiation à la Recherche (SIR)

Année	Étudiant(e)	Sujet	Co-encadrement	Valorisation
2018-2019	SCHENONE Laurence	Caractérisation du méthylome du syndrome de Richter	-	
2018-2019	JULIEN Mélissa	Mise au point d'un modèle cellulaire surexprimant <i>PTPN12</i>	Dr Natacha DREUMONT	
2019-2020	ZIEGLER Caroline	Caractérisation transcriptomique du syndrome de Richter	-	

Tableau 9. Liste des étudiants encadrés en SIR (Stage d'Initiation à la Recherche).

4.3.2. Master

Année	Étudiant(e)	Sujet	Co-encadrement	Posters	Présent. orales	Prix	Publications
2016-2017	CHRISTOPHE Armelle	Etude par Western Blot du niveau d'expression de la protéine Ku-70 du complexe NHEJ dans les syndromes lymphoprolifératifs B	Dr Aurore PERROT				
2016-2017	ZOTOGLO Serge	Étude du niveau d'expression de la protéine Ku70 chez des patients atteints de la maladie de Waldenström,	Dr Aurore PERROT				
2016-2017	MANENQ Christine	Analyse de l'évolution tumorale en syndrome de Richter chez des patients atteints d'une Leucémie Lymphoïde Chronique					
2017-2018	DIVOUX Marion	Etude génomique par séquençage d'exome, des ARS-T triples négatives (JAK2V617F, MPL, CALR)	Sébastien HERGALANT		1		
2018-2019	MORIZOT Romain	Caractérisation protéomique du syndrome de Richter	Dr Aurore PERROT		1	1	
2019-2020	AUGÉ Hélène	Caractérisation transcriptomique du syndrome de Richter	Sébastien HERGALANT				1*
2019-2020	PIUCCO Romain	Caractérisation protéomique du syndrome de Richter	Sébastien HERGALANT			1	
2019-2020	MOULIN Charline	Étude clinico-biologique du syndrome de Richter ; Étude rétrospective sur une grande cohorte Française de 103 cas	Pr Francis GUILLEMIN Pr Pierre FEUGIER				1*

Tableau 10. Liste des étudiants encadrés en Master, avec valorisation scientifique.
*publication soumise

BSIS : BioSciences et Ingénierie de la Santé. Université de Lorraine.

AMIP : Master Aspects Moléculaires et Intégrés de la Physiopathologie. Université de Lorraine.

BC2T : Master Biochimie, Cellules, Cibles Thérapeutiques. Université Paris Diderot.

BNMQ : Master Bioingénierie, Nanosanté, Médicaments, Qualité.

RBS : Master Sciences du Vivant parcours Recherche en Biologie Santé.

ERCE : Master Santé Publique, Parcours Epidémiologie, Recherche Clinique, Evaluation.

4.3.3. Thèses d'État et thèses d'Université

Année	Étudiant(e)	Sujet	Co-encadrement	Posters	Présent. orales	Prix	Publications
2014-2016	MANENQ Christine	Doctorat d'État en Pharmacie Détection de l'invasion métastatique médullaire par des cellules de neuroblastome par une méthode de cytométrie en flux multiparamétrique	Dr Véronique LATGER- CANNARD	1	1		1
2019-2021	MOULIN Charline	Doctorat d'État en Médecine Étude clinico-biologique du syndrome de Richter ; Étude rétrospective sur une grande cohorte Française de 103 cas	Pr Pierre FEUGIER	1	1		
2019-2020	MORIZOT Romain	Doctorat d'État en Médecine Caractérisation protéomique du syndrome de Richter par une étude comparative avec les autres types de lymphomes agressifs	Dr Aurore PERROT		1		
2018-2021	DIVOUX Marion	Thèse d'Université Approche génomique des syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs /myélodysplasiques	Pr Pierre FEUGIER		1	1	1

Tableau 11. Liste des étudiants encadrés en Thèse, avec valorisation scientifique.

4.3.4. Valorisation du travail des étudiants encadrés

Articles valorisant un travail de Thèse

Manenq C, Latger-Cannard V, Lesesve JF, Dreumont N, Massin F, Salignac S, Devignes J, Mansuy L, Chastagner P, and **Broséus J**. Combined use of multiparametric flow cytometry and cytomorphology to enhance detection of neuroblastoma metastatic cells in bone marrow. *International Journal of Laboratory Hematology* **2020**; 42:52-60.

Divoux M, Plocque A, Sevin M, Voillat L, Guerci-Bresler A, Girodon F and **Broséus J**. Efficacy of Lenalidomide in Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms with Ring Sideroblasts and an extreme platelet count. *Clin Case Rep.* **2020**. DOI: 10.1002/ccr3.3026.

Articles valorisant un travail de Master

Augé H, Notarantonio AB, Morizot R, Quinquenel A, Fornecker LM, Hergalant S, Feugier P and **Broséus J**. Genomic landscape and microenvironment remodeling in Diffuse Large B-Cell histologic variant of Richter Syndrome. *Review. Soumise à Frontiers in Immunology le 17 août 2020*.

Moulin C, Guillemain F, Remen T, Bouclet F, Augé H, Quinquenel A, Dartigeas C, Morizot R, Lomazzi S, Busby H, Hergalant S, Tausch E, Tomowiak C, Leblond V, Thieblemont C, Cymbalista F, Laribi K, Béné MC, Stilgenbauer S, Guièze R, Feugier P*, **Broséus J***. *Equal contribution. Clinico-Biological, Molecular and Prognostic Features of Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma-Variant of Richter Syndrome: a Multicenter Retrospective Study of the French Innovative Leukemia Organization. Article original. *Soumise à Haematologica le 24 août 2020*.

Dr Julien BROSEUS

Présentations orales valorisant un travail de Master ou de Thèse

Morizot R, Broséus J, Hergalant S, Moulin C, Augé H, Cianferani S, Carapito C, Feugier P, Perrot A, Fornecker LM. Caractérisation protéomique du syndrome de Richter (SR). 6^{èmes} journées d'échanges sur la recherche en cancérologie en Lorraine. **2020**.

Divoux M, Hergalant S, Feugier P, Girodon F et **Broséus J**. Étude génomique des MDS/MPN-RS-T triples-négatifs (*JAK2*, *MPL*, et *CALR* non-mutés). 6^{èmes} journées d'échanges sur la recherche en cancérologie en Lorraine. **2020**.

Moulin C, Morizot R, Remen T, **Augé H**, Bouclet F, Lomazzi S, Dartigeas C, Quinquenel A, Busby H, Tomowiak C, Leblond V, Thieblemont C, Cymbalista F, Béné MC, Guieze R, Feugier P*, **Broséus J***. Caractéristiques clinico-biologiques et évolution des patients présentant un syndrome de Richter : une étude multicentrique du groupe FILO. Journée des Jeunes Experts dans la leucémie - Toulouse - **2019**.

Morizot R, Broséus J, Hergalant S, Moulin C, Augé H, Cianferani S, Carapito C, Feugier P, Perrot A, Fornecker LM. Caractérisation protéomique du syndrome de Richter (SR). Journée des Jeunes Experts dans la leucémie - Toulouse - **2019**.

Divoux M, Hergalant S, Feugier P, Girodon F et **Broséus J**. Étude génomique des MDS/MPN-RS-T triples-négatifs (*JAK2*, *MPL*, et *CALR* non-mutés). 5^{èmes} journées d'échanges sur la recherche en cancérologie en Lorraine. **2019**.

Manenq C, Lesesve JF, Dreumont N, Massin F, Salignac S, Mansuy L, Chastagner P, Latger-Cannard V and **Broséus J**. Évaluation de la détection des cellules métastatiques médullaires de neuroblastome par cytométrie en flux multiparamétrique. 2^{ème} journée Interrégionale Recherche et Pédiatrie. Strasbourg, 2016.

Présentations affichées valorisant un travail de Thèse ou de Master

Moulin C, Morizot R, Remen T, Augé H, Bouclet F, Lomazzi S, Dartigeas C, Quinquenel A, Busby H, Tomowiak C, Leblond V, Thieblemont C, Cymbalista F, Béné MC, Guieze R, **Broséus J**, Feugier P. Clinical and Biological Characteristics and Outcomes of Richter Transformation: A French Multicenter Study from the Filo Group. Annual meeting of the American Society of Hematology, Orlando, **2019**.

Manenq C, Broséus J, Lesesve JF, Massin F, Devignes J, Mansuy L, et al. Evaluation de la détection des cellules métastatiques médullaires de neuroblastome par cytométrie en flux multiparamétrique. Congrès annuel de la Société Française d'Hématologie, Paris, **2016**.

Prix

Marion DIVOUX (Étudiante en Thèse d'Université – codirection avec le Professeur FEUGIER) : Prix de l'École Doctorale BioSE (Biologie Santé Environnement) pour son travail de Thèse (novembre 2019).

Romain MORIZOT (Étudiant de Master 2 en 2018-2019) : Prix FILO 2000 euros pour son travail sur la protéomique du Syndrome de Richter (Congrès annuel du FILO, Toulouse 2019).

Romain PIUCCO (Étudiant de Master 2 en 2019-2020) : Prix FILO 2000 euros pour son travail sur la protéomique du Syndrome de Richter (Congrès annuel du FILO, Nancy 2020).

Dr Julien BROSEUS

Participation à des jurys (thèse, master, ingénieur, thèse d'exercice)

Année universitaire	Nom, prénom	Niveau d'étude	Sujet	Position au sein du jury
2013-2014	BERIONNI Anne-Laure	Doctorat d'État en Pharmacie	Les inhibiteurs de JAK 2, espoir thérapeutique dans la prise en charge des néoplasies myéloprolifératives Phi négatives ?	Examineur
2015-2016	MANENQ Christine	Doctorat d'État en Pharmacie	Détection de l'envahissement métastatique médullaire par des cellules de neuroblastome par une méthode de cytométrie en flux multiparamétrique	Co-directeur de Thèse
2015-2016	SCHWALLER Hélène	Doctorat d'État en Pharmacie	Bêta-thalassémie majeure et lymphocytose. Etude rétrospective et prospective d'une cohorte de 16 patients suivis au CHRU de Nancy	Examineur
2016-2017	ZANFONATO Thomas	SIR	Flow Cytometry Procedure Adjustment for the evaluation of NK cell's Cytotoxicity	Examineur
2017-2018	CLERC Gabrielle	Doctorat d'État en Médecine	Pemphigoïde bulleuse avec atteinte des muqueuses oro-pharyngées et digestives hautes (oesophagite disséquante), associée à une hémophilie A : rôle de la diffusion du répertoire auto-immun ?	Examineur

Tableau 12. Liste des jurys auxquels le candidat a participé

Dr Julien BROSEUS

4.4. Demande d'Autorisation à Co-encadrer une Thèse (janvier 2019)

Projet de Thèse d'Université (Marion DIVOUX) : Approche génomique des syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs/myélodysplasiques.

Directeur de Thèse : Pierre FEUGIER, PU-PH en Hématologie Clinique, CHRU de Nancy, Inserm U1256.

Codirecteur de Thèse : Julien BROSEUS, MCU-PH en Hématologie Biologique, CHRU de Nancy, Inserm U1256.

Doctorante : Marion DIVOUX, Interne du DES d'Hématologie, CHRU de Brabois, Inserm U1256.

Ce projet de thèse comporte deux volets dédiés aux pathologies de la moelle osseuse (syndromes mixtes myélodysplasiques et myéloprolifératifs d'un coté, syndromes myélodysplasiques purs de l'autre), indépendants, mais s'appuyant sur les réseaux de recrutement hospitaliers (Nancy, Dijon), sur les plateformes techniques locales (Centre de Ressources Biologiques Lorrain, séquençage haut débit, méthylome sur puces Illumina) et sur les compétences de l'équipe en matière d'analyse bioinformatique.

Partie 1 : étude génomique des MDS/MPN-RS-T triples-négatifs (*JAK2*, *MPL*, et *CALR* non-muté).

Introduction

Les syndromes mixtes myélodysplasiques/myéloprolifératifs avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose ou « *Myelodysplastic/Myeloproliferative Syndromes with Ring Sideroblasts and Thrombocytosis* » (MDS/MPN-RS-T) sont des hémopathies malignes rares, appartenant à la famille des syndromes mixtes myéloprolifératifs/myélodysplasiques, qui présentent un profil moléculaire spécifique, associant une anomalie responsable du caractère myéloprolifératif (conduisant à un excès de cellules sanguines matures) et une anomalie responsable du caractère myélodysplasique (conduisant à des anomalies morphologiques de la lignée myéloïde et à une apoptose intra-médullaire des précurseurs).⁽³⁾

Le caractère myélodysplasique des MDS/MPN-RS-T peut être expliqué par des mutations affectant des gènes codant pour des acteurs de l'épissage alternatif, comme *SF3B1* (85-90%), *SRSF2* (7%), *U2AF35* (4%) et *ZRSR2* (3%), et/ou des mutations affectant des gènes codant pour des acteurs de la régulation épigénétique comme *ASXL1* (15-29%), *TET2* (10-25%), *EZH2* (7%), *DNMT3A* (13-15%), *SETBP1* (13%) et *IDH2* (0-4%).^(36, 37, 54, 55)

En revanche, les déterminants moléculaires du versant myéloprolifératif des MDS/MPN-RS-T ne sont pas totalement élucidés.

Le panorama mutationnel des syndromes myéloprolifératifs purs, chromosome Philadelphie négatifs, sont dominés par les mutations gain de fonction de l'exon 14 de *JAK2* (Janus Kinase 2),⁽⁴⁾ les mutations faux-sens situées dans l'exon 10 de *MPL* (*Myeloproliferative Leukemia*),⁽¹⁷⁾ et les insertions/deletions décalant le cadre de lecture, situées dans l'exon 9 de *CALR* (Calreticuline) qui mènent à l'activation autocrine du récepteur à la Thrombopoïétine.^(20, 21)

Mais dans le contexte des MDS/MPN-RS-T, les mutations de *JAK2*, *MPL* et *CALR* ne sont présentes respectivement que dans 42-57%, 1-3% et 0-1% des cas,^(31, 41, 54, 55) ce qui signifie que près de 50% des MDS/MPN-RS-T ne sont pas porteuses d'une mutation connue pour être responsable du caractère prolifératif.

Objectif

Notre but est d'identifier la ou les mutation(s) responsable(s) du caractère myéloprolifératif dans les MDS/MPN-RS-T triple négatifs.

Dr Julien BROSEUS

Avancée du projet

Durant un travail réalisé au cours du stage de Master II (année universitaire 2017-2018), les exomes de 6 cas index de MDS/MPN-RS-T triple négatifs ont été séquencés, ce qui a permis d'identifier 49 mutations candidates. Une partie de ces candidats ont été confirmés sur une grande cohorte de validation, en lien avec nos collègues Allemands du MLL (*Munich Leukemia Laboratory*). Actuellement, nous évaluons les conséquences fonctionnelles d'une surexpression de *PTPN12*, d'abord sur un modèle cellulaire HEK293 puis sur un modèle hématopoïétique type KG1a. Ce projet est mené en partenariat avec le Professeur François GIRODON (CHU de Dijon, Inserm U1231, Dijon) et dispose d'un financement.

Par ailleurs, nous souhaitons compléter l'étude de l'exome par une étude du méthylome par puce *INFINIUM® Methylation EPIC 850K* (Illumina, San Diego, CA, États-Unis d'Amérique).

Partie 2 : Étude méthylome/transcriptome des SMD avec excès de blastes traités par agents déméthylants.

Introduction

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont les hémopathies malignes myéloïdes les plus fréquentes dans les pays industrialisés. Elles touchent essentiellement les sujets de plus de 65 ans. Il s'agit d'un ensemble hétérogène de pathologies clonales de la cellule souche hématopoïétique, caractérisées par l'accumulation d'anomalies cytogénétiques responsables d'une apoptose intra-médullaire, de cytopénies sanguines (anémies, neutropénies, thrombopénies), d'anomalies morphologiques des cellules de la lignée myéloïde et dans certains cas d'un excès de cellules blastiques sanguines et/ou médullaires.⁽⁵⁶⁾ Les SMD avec excès de blastes font partie des SMD de haut risque, qui présentent un risque élevé d'évolution vers une leucémie aiguë myéloblastique secondaire, dont le pronostic est très réservé.

Sur le plan physiopathologique, les SMD relèvent d'anomalies épigénétiques en particulier de la dérégulation de la méthylation des gènes, en lien avec des mutations de *TET2* et *DNMT3a*.^(56, 57) Les SMD présentent des anomalies du profil de méthylation, avec une hypométhylation globale, mais une hyperméthylation des zones régulatrices de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur, entraînant leur sous-expression.^(58, 59)

Les stratégies thérapeutiques actuelles reposent sur l'utilisation d'agents « hypométhylants », la 5'-azacytidine (Azacytidine) notamment. Ces produits sont des analogues de la cytosine incorporés dans l'ADN durant la phase S. Leur action hypométhylante passe par une inhibition des DNA Methyl Transferases (DNMT). L'Azacytidine possède une double action, hypo-méthylante et cytotoxique, qui permet de restaurer l'hématopoïèse et d'obtenir une réponse dans 50% des cas. L'évaluation de l'efficacité de l'Azacytidine repose sur les critères cliniques et biologiques de l'*International Working Group* (IWG) : (i) la réponse clinique (indépendance transfusionnelle, amélioration de l'état général) et (ii) la réponse biologique (normalisation de l'hémogramme, du myélogramme et du caryotype médullaire).⁽⁶⁰⁾

L'amélioration de ces paramètres peut toutefois être longue à apparaître et il n'existe pas de marqueur précoce de réponse. Dans plus de 85% des cas, ces critères ne sont pas évaluable avant au moins 6 mois, en raison d'une amélioration médullaire et sanguine tardive. Or environ 50% des patients sont finalement considérés comme non-répondeurs et seront restés sous traitement plusieurs mois, sans bénéfice final. En cas de progression de la maladie ou de non-réponse, le traitement est arrêté et la prise en charge devient palliative.

L'évaluation précoce de la réponse au traitement est au cœur des préoccupations actuelles. Les « *Differentially Methylated Regions* » (DMR), sont des régions de l'ADN dont le niveau de méthylation peut varier selon les patients. L'analyse des niveaux de méthylation de ces DMR peut révéler des profils corrélés à

Dr Julien BROSEUS

la réponse.^(61, 62) L'étude concomitante du transcriptome permet d'identifier les DMR pertinents, dont la réversion du niveau de méthylation est associée à la réexpression de gènes déterminants dans l'efficacité thérapeutique, à savoir la reprise d'une hématopoïèse normale.

Objectifs

- Comparer, entre répondeurs et non-répondeurs à l'Azacytidine, les *Differentially Methylated Regions* (DMR) dont le niveau de méthylation a changé entre le diagnostic et la fin du 3ème cycle mensuel de traitement afin d'identifier précocement des profils de méthylation prédictifs de la réponse à l'Azacytidine.
- Identifier dès le diagnostic les profils des DMR prédictifs de la réponse à l'Azacytidine.
- Identifier les gènes dont le niveau d'expression est corrélé à ces profils de méthylation des DMR

Avancée du projet

Le projet s'appuie sur l'étude prospective *MYRAGE* (Myélodysplasies de haut Risque, étude Génétique et Épigénétique ; N° *ClinicalTrials.gov* : NCT03217903), portée par le CHRU de Nancy et incluant le recrutement de malades atteints de SMD avec excès de blastes, traités par Azacytidine et suivis pendant 12 mois. Un prélèvement médullaire est réalisé au diagnostic et après 3 mois de traitement pour extraction des ADN et des ARN puis étude du méthylome et du transcriptome.

Les accords administratifs (CPP, ANSM) ont été obtenus, de même qu'un financement pour l'analyse du méthylome des échantillons sur puce *INFINIUM® Methylation EPIC 850K* (Illumina) sur la plateforme de l'unité Inserm U1256 couplée à une étude du transcriptome par RNA-seq sur les mêmes échantillons.

La moitié des inclusions sont réalisées au 9/8/2020.

Dr Julien BROSEUS

Participation à la formation « encadrer un doctorant ».

Volume horaire : 12h00

Réalisé par : ADOC METIS (Figures 8 et 9)

Public concerné : Encadrants de thèse, expérimentés comme débutants mais les encadrants débutants (demande d'ACT, en cours de HDR) y sont plus particulièrement incités

Objectif : Sensibiliser les encadrants de thèse aux enjeux de l'encadrement, par l'information sur le contexte européen et français, des échanges de pratiques et des partages d'expérience.

La formation est déclinée en trois temps enchaînés sur une session de deux jours consécutifs :

JOUR 1 – MATIN	Conférence de sensibilisation aux enjeux de l'encadrement, dans le contexte français et européen et à l'université de Lorraine (1/2 journée, format conférence ouverte).
JOUR 1 – APRES-MIDI	Ateliers de partage de pratiques (petit groupe),
JOUR 2	Journée de formation liminaire abordant les fondamentaux de l'encadrement doctoral (petit groupe),

Conférence de sensibilisation aux enjeux de l'encadrement doctoral :

Son objectif est de fournir aux encadrant·e·s un panorama des enjeux actuels de l'encadrement doctoral qui leur permette d'être informé·e·s du cadre règlementaire et stratégique lié au doctorat, de faire connaissance avec les différents acteurs du doctorat au sein de l'Université de Lorraine mais aussi d'être interpellé·e·s et sensibilisé·e·s aux travaux et aux pratiques qui se développent autour de l'encadrement doctoral.

Axe 1 : Qu'est-ce que le doctorat ? Cadres, évolutions et rôles liés au doctorat

- Cadres réglementaires du doctorat : en Europe (Charte européenne du Chercheur et Code de conduite pour le recrutement des chercheurs et HRS4R), en France (textes de loi relatifs au doctorat), à l'Université de Lorraine (Charte du doctorat, fonctionnement des structures)
- Droits et devoirs des doctorant·e·s et des encadrant·e·s
- Dispositif doctoral à l'Université de Lorraine

Axe 2 : Pourquoi le doctorat ? Quels enjeux, quels défis pour l'encadrement doctoral ?

- Revue de la littérature scientifique sur l'encadrement doctoral,
- Aperçu des besoins des doctorant·e·s et des conditions de leur efficacité,
- Compétences et carrières des docteur·e·s,
- Attractivité et opportunités en termes de poursuite de carrière sur le territoire,

L'atelier de partage de pratiques permet aux participants d'échanger sur leur expérience directe ou indirecte à partir d'un thème portant sur les enjeux de l'encadrement doctoral.

Le séminaire propose des outils pour les différentes facettes de l'activité d'encadrant·e doctoral·e :

- Suivi des travaux de recherche du/de la doctorant·e
- Montée en compétence du/de la doctorant·e et prise de conscience de ses compétences
- Responsabilisation du/de la doctorant·e vis-à-vis de son projet professionnel
- Transmission des valeurs intrinsèques à la recherche académique et des principes d'éthique et d'intégrité scientifique.
- Motivation et re-motivation du/de la doctorant·e
- Évolution des modalités de collaboration au sein du binôme encadrant·e–doctorant·e

Formation des encadrants de thèse 13-14 juin 2019

Détail des journées:

Organisation : des sessions de deux jours consécutifs pour des séminaire/atelier participatifs réunissant une quinzaine de personnes.

Objectif : acquérir une vue d'ensemble du système doctoral et des premiers outils de gestion de leurs relations avec les doctorant-e-s qu'elles/ils encadrent

Programme détaillé

Jour 1

Introduction (1h30)

Le pilotage du projet doctoral (4h)

L'objectif de ce module est de fournir aux encadrant-e-s les outils et méthodes leur permettant de suivre efficacement l'avancée des travaux de leurs doctorant-e-s. Le module traite donc :

- de la définition d'un projet de recherche et des fonctions d'un-e chef-fe de projet,
- de l'intégrité scientifique et des enjeux d'éthiques inhérents à la recherche
- de l'autonomisation croissante du/de la doctorant-e,
- de la façon de fixer des objectifs pour assurer leur compréhension et la motivation,
- de l'utilisation de techniques de planification adaptées à un projet doctoral.

La préparation de la poursuite de carrière (1h)

L'objectif de ce module est de sensibiliser les encadrant-e-s aux réalités des démarches de recherche d'emploi et de les informer sur les possibilités de poursuite de carrière ouvertes par les compétences transverses des docteur-e-s. Le module traite donc :

- des statistiques de poursuite de carrière des docteur-e-s en France,
- des compétences transverses des docteur-e-s,
- des outils de la recherche d'emploi et de leurs rôles,
- des méthodes de construction du projet professionnel pour un-e docteur-e.

Jour 2

La gestion des relations humaines (4h)

Les objectifs de ce module sont de faciliter la relation d'encadrement et de développer et valoriser les compétences du/de la doctorant-e (compétences scientifiques, compétences techniques, savoir-faire transverses). Le module traite donc :

- du positionnement et du rôle de l'encadrant-e,
- de la motivation, de la re-motivation et de l'acquisition de l'autonomie,
- des méthodes de communication bienveillante facilitant la relation et la bonne réception des retours critiques,
- des différentes phases de l'encadrement et des besoins spécifiques des doctorant-e-s à chaque phase,
- d'une boîte à outils permettant d'encadrer les doctorant-e-s sur une longue durée (trois années).

Atelier de partage de pratiques (2h30)

Clôture et temps d'échange

La conclusion de chaque session se fera par un temps d'échange avec un-e représentant-e de l'Université de Lorraine.

- un temps de présentation de la politique doctorale spécifique de l'Université de Lorraine (45min),
- un temps d'échange avec les participant-e-s (15min).

Figure 8. Programme de la formation d'encadrant de Thèse d'Université des 13 et 14 juin 2019



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

ATTESTATION DE FORMATION

Encadrant.e de thèse

Dates : 13 et 14 juin 2019

Objectifs :

Fournir aux encadrant.e.s un panorama des enjeux actuels de l'encadrement doctoral :
cadrage, montage, pilotage : chaque étape-clé est explorée

Le séminaire propose à travers des **ateliers de partage de pratiques** des outils pour les différentes facettes de l'activité d'encadrant.e doctoral.e :

- suivi des travaux de recherche du/de la doctorant.e
- montée en compétence du/de la doctorant.e et prise de conscience de ses compétences
- responsabilisation du/de la doctorant.e vis-à-vis de son projet professionnel
- transmission des valeurs intrinsèques à la recherche académique et des principes d'éthique et d'intégrité scientifique.
- motivation et re-motivation du/de la doctorant.e
- évolution des modalités de collaboration au sein du binôme encadrant.e-doctorant.e

Il permet également aux participants d'échanger sur leur(s) expérience(s) directe ou indirecte à partir d'un thème portant sur les enjeux de l'encadrement doctoral

Je soussigné Marc Dalaut, Sous-Directeur des Etudes Doctorales, atteste que :

Monsieur BROSEUS Julien

Ecole Doctorale Biologie Santé Environnement (BIOSE)

Fait à Nancy, le 26 novembre 2019

Dr Julien BROSEUS

4.5. Mission de longue durée : Mobilité à Ulm (2017-2018)

Ma mobilité postdoctorale dans le laboratoire du Professeur Stephan STILGENBAUER à Ulm en Allemagne (30.10.2017-02.11.2018) s'inscrit dans le développement de mon projet de recherche, incluant l'apprentissage de nouvelles techniques, un renforcement thématique vers la LLC et le SR, et la construction de collaborations internationales avec l'un des leaders mondiaux dans ce domaine et son réseau. Cette mobilité s'inscrit dans une volonté de rapprochement entre le FILO (*French Innovative Leukemia Organization*) et le Professeur STILGENBAUER, avec la construction d'une collaboration durable (**Figure 10**).

Sur le plan technique, mon stage à Ulm m'a donné la possibilité de me former aux techniques d'exploration classiquement utilisées dans le cadre de la LLC : FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), identification du statut mutationnel du gène *IgHV* (*GeneScan* puis séquençage par méthode *Sanger*), identification du statut mutationnel du gène *TP53* (*dHPLC-Wave* puis séquençage par méthode *Sanger*), ceci dans un centre de référence en Europe, affilié au réseau ERIC (*European Research Initiative in CLL*). Le laboratoire de la Clinique Universitaire d'Ulm utilise aussi le séquençage haut débit ciblé dans le contexte de la pratique clinique, avec enrichissement par méthode par amplicons (*Illumina TruSeq Custom Amplicons*) et séquençage sur *MiSeq* (Illumina).

Cette année de mobilité m'a donné la possibilité de continuer à travailler sur plusieurs projets de recherche nationaux et internationaux :

- Un projet sur l'évolution tumorale entre stade LLC et stade Richter, mené sous la direction du Professeur Romain GUIEZE et du Docteur Catherine WU (*Dana Farber Cancer Institute*, Boston, États-Unis), en collaboration avec le Professeur Stephan STILGENBAUER (*Universität Klinikum Ulm*, Allemagne) et le groupe FILO.
- Un projet ayant pour but de décrire les mécanismes de résistance tumorale du syndrome de Richter par l'identification des voies cellulaires dérégulées, ceci par une analyse combinée de l'exome, du transcriptome, du méthylome et du protéome comprenant une analyse comparative avec les LBDGC secondaires hors Richter. Ce projet est mené sous l'égide du groupe FILO et inclut une collaboration internationale avec Ulm.
- Un projet sur l'étude de l'ADN tumoral circulant dans le contexte de la LLC et de son évolution en SR. L'objectif est de bâtir un projet collaboratif entre le groupe FILO et le Professeur STILGENBAUER et son équipe. Dans le cadre de ma mobilité, j'ai accompagné l'équipe en Suisse à Bellinzona dans le laboratoire du Docteur Davide ROSSI, qui travaille dans ce domaine et dont l'équipe possède une grande maîtrise des aspects techniques du séquençage.


Outre la participation à la réflexion dans le cadre des projets centrés sur l'étude de la résistance thérapeutique aux nouvelles thérapies ciblées dans la LLC, le Professeur Stephan STILGENBAUER m'a confié un projet principal, à développer en lien avec son équipe (Dr Eugen TAUSCH, Dr Annika SCHEFFOLD, Dr Billy JEBARAJ). Il s'agit d'un projet visant à explorer l'évolution clonale dans la LLC, me permettant d'avoir accès aux techniques de séquençage haut débit utilisées actuellement à Ulm pour séquencer des panels restreints de gènes. La méthode d'enrichissement utilisée actuellement à Ulm est une méthode par amplicons : *TruSeq Custom Amplicon* (Illumina), mais nous allons la confronter à la méthode par capture utilisée par l'équipe de Davide ROSSI à Bellinzona : *Nimblegen SeqCap EZ Library SR* (Roche, Bâle, Suisse). Le séquençage lui-même est réalisé sur des séquenceurs utilisant la technologie Illumina. L'objectif est de définir le meilleur protocole d'analyse dans la perspective de l'étude de l'ADN génomique et de l'ADN tumoral circulant.



UNIVERSITÄT ULM



DIE DEUTSCHEN
UNIVERSITÄTSKLINIKA



UNIVERSITÄTS
KLINIKUM
ulm

UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM | Zentrum für Innere Medizin | D-89070 Ulm

Certificate for post-doctoral stay as a full-time researcher in Ulm from 30.10.2017 to 2.11.2018.

I hereby attest that Dr Julien Broséus accomplished his post-doctoral stay as a full-time researcher in my laboratory, from the 30.10.2017 to the 2.11.2018 (included).

During his stay, Dr Julien Broséus had access to funding for consumables and research infrastructure, including state of the art molecular biology equipments and a large collection of over 8,000 CLL patients accrued from various clinical trials. In this context of fully annotated samples with biological characteristics and clinical data, we provided profound background and infrastructure as a basis for successful development of Dr Broséus projects.


During his stay, Dr. Broséus actively participated to several research projects on CLL, the main project being dedicated to clonal evolution in CLL. Dr Broséus performed the sequencing of more than 1,000 samples, here in our institution and the analysis is currently ongoing. We plan to keep working together on these projects in the future, on the basis of regular meetings.

Furthermore, Dr Broséus is currently working on a French-German collaborative project on Richter syndrome, including methylation pattern and RNA expression analysis. As part of this collaborative project, Dr. Broséus processed Richter samples in my laboratory to achieve the experiments that are critical for the success of this joint project with the French CLL group.

Overall, this post-doctoral stay allowed us to strengthen our bonds with the French CLL study group and provided an extremely promising framework for developing new scientific initiatives with Dr. Broséus, as part of international programs for collaborative research.

Certificate written to all intents and purposes,

Sincerely,



Prof. Stephan Stilgenbauer

UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM Anstalt des Öffentlichen Rechts, Sitz Ulm | UST-ID. Nr. DE147040060
Vorsitzender des Aufsichtsrats: Ulrich Steinbach. Vorstand: Prof. Dr. Udo X. Kaisers (Vorsitzender),
Dr. Joachim Stumpp (Stellv.), Prof. Dr. Peter Möller, Prof. Dr. Thomas Wirth, Silvia Cohnen.
Sparkasse Ulm IBAN: DE16 6305 0000 0000 1064 78 BIC: SOLADES1ULM

ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN

Klinik für Innere Medizin III
Hämatologie, Onkologie,
Palliativmedizin, Rheumatologie
und Infektionskrankheiten

Ärztlicher Direktor
Prof. Dr. H. Döhner
Albert-Einstein-Allee 23
D-89081 Ulm

Sekretariat
sekr-dir.innere3@
uniklinik-ulm.de
T: 0731 500 45501
F: 0731 500 45505

Prof. Dr. S. Stilgenbauer
Leitender Oberarzt
T: 0731 500 45521
F: 0731 500 45525

5th of November 2018

Figure 10. Attestation de mobilité post-doctorale.

4.6. Recherche post-doctorale : évolution sous-clonale spontanée au cours de l'histoire naturelle de la leucémie lymphoïde chronique de stade A selon la classification de Binet.

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) constitue la forme de leucémie la plus fréquente en Europe et en Amérique du Nord.⁽⁶³⁾ Bien qu'étant considérée comme une hémopathie lymphoïde B indolente, la LLC représente en réalité un ensemble très hétérogène du point de vue de l'évolution clinique, allant de la maladie non ou peu évolutive à des formes agressives (Müller-Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D, Campo E, Harris NL, Stein H. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, eds. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th edn. Lyon, France: IARC; 2008. pp. 180-2). La classification de Binet définit 3 groupes pronostiques, selon : (i) le nombre d'aires ganglionnaires atteintes, (ii) le taux d'hémoglobine et (iii) la numération plaquettaire.⁽⁶⁴⁾ Avec l'amélioration et la standardisation des recommandations diagnostiques,^(65, 66) plus de 80% des LLC sont aujourd'hui diagnostiquées au stade A de la classification de Binet. L'hétérogénéité des évolutions cliniques chez les patients atteints de LLC repose aussi sur la définition de deux sous-types définis par leur degré d'hypermutation somatique du gène *IgHV*, les LLC porteuses d'un gène *IgHV* non muté étant associées à un plus mauvais pronostic, comparativement aux LLC porteuses d'un gène *IgHV* muté.^(67, 68)

Grâce à l'avènement de la *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH), une étude fondatrice a permis d'identifier les principales anomalies cytogénétiques associées à la LLC.⁽⁶⁹⁾ Elle a été complétée secondairement par la découverte d'anomalies de nombre de copie(s) génique(s) plus petites et moins fréquentes, rendue possible par l'usage des puces à ADN de type *SNP array*.^(70, 71) Les anomalies les plus fréquentes sont : la délétion 13q (del 13q), la délétion 11q (del 11q), la délétion 17p (del 17p), et la trisomie 12 (tri(12)), qui englobent plusieurs gènes-clé de la physiopathologie de la LLC, comme *miRNA 15a/16-1* (del 13q), *ATM* et *BIRC3* (del 11q) ou *TP53* (del 17p). Ces anomalies définissent différents sous-groupes de pronostic différent.⁽⁶⁹⁾

L'utilisation des techniques de séquençage haut débit a permis de définir avec précision le panorama mutationnel de la LLC. Celui-ci apparaît hautement hétérogène, caractérisé par un spectre très large, avec des mutations affectant différentes fonctions cellulaires comme : (i) la réponse aux dommages de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire (*TP53*, *ATM*, *POT1*, *ATRX*), (ii) la maturation et l'export des ARN (*SF3B1*, *XPO1*, *RPS15*, *DDX3X*, *ZNF292*, *MED12*, *NXF1*), (iii) la voie NOTCH (*NOTCH1*, *FBXW7*), (iv) le signal du BCR et la maturation au sein du centre germinatif ganglionnaire (*EGR2*, *KLHL6*, *BCOR*, *IRF4*, *IKZF3*, *ITKB*, *CARD11*), (v) la physiologie chromatinienne (*CHD2*, *BAZ2A*, *SETD2*, *ASXL1*, *ZMYM3*, *HIST1H1E*, *ARID1A*), (vi) la voie NFkB (*BIRC3*, *MYD88*, *TRAF3*, *NFKB1E*), (vii) la réponse inflammatoire (*SAMHD1*, *RIPK1*), (viii) la lymphopoïèse B précoce (*IKZF3*, *PAX5*), (ix) la voie MAPK-ERK (*MAPK*, *MAP2K1*, *ERK*, *BRAF*, *KRAS*) et (x) la signalisation liée à MYC (*MGA*, *PTPN11*). La distribution et les fréquences de ces anomalies sont différentes selon le statut mutationnel du gène *IgHV*.⁽⁷²⁻⁷⁷⁾ Les mutations de *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1*, *ATM*, *BIRC3*, *XPO1*, *POT1* et *RPS15* sont associées à un mauvais pronostic.^(73, 75, 76, 78-82)

Même si les définitions varient selon les références, une mutation « sous-clonale » est une mutation présente dans une fraction mineure (seuils de définition variables) des cellules composant une tumeur, indiquant un événement tardif. En revanche, une mutation dite « clonale » intéresse une forte proportion des cellules tumorales, ce qui suggère un événement précoce de la genèse tumorale. Différents profils d'évolution clonale sont décrits dans la LLC. Ceux-ci dépendent des caractéristiques mutationnelles de chaque sous-clone et de l'influence du traitement sur l'architecture clonale.^(74, 76, 83) Ceci mène à la définition du « *fit subclone* », ou « sous-

Dr Julien BROSEUS

clone adapté”, que l’on peut définir comme un sous-clone arborant une ou plusieurs mutations lui conférant un avantage sélectif contre le traitement, ce qui en fait un acteur majeur de la progression de la maladie et de la rechute sous traitement. Dans la mesure où ces gènes ont été décrits comme étant associés à la progression de la maladie et à sa chimiorésistance, les mutations de *TP53*, et dans une moindre mesure de *SF3B1*, *ATM*, *BIRC3* et *NOTCH1* définissent un “*fit subclone*”.^(74, 76, 84-90)

Avec les méthodes d’enrichissement à présent disponibles dans le cadre de la préparation des bibliothèques de séquençage, il est maintenant possible de concentrer l’analyse sur un panel de gènes d’intérêt, ceci avec une meilleure sensibilité que le séquençage selon la méthode de Sanger, l’actuelle méthode de référence.⁽⁹¹⁾ Ceci permet la détection de fractions alléliques de très petites tailles, auparavant indétectables en raison de la limite de détection (10-15%) de la méthode Sanger. Plusieurs équipes ont souhaité étudier les sous-clones dans la LLC, en particulier ceux qui sont porteurs de mutations connues pour leur valeur pronostique. L’application des méthodes d’enrichissement actuelles permettent la détection de sous-clones très minoritaires, se situant en dessous du seuil de 1% de fraction allélique. La présence de sous-clones minoritaires non détectés par la méthode Sanger est loin d’être inhabituelle dans la LLC. Des fractions cellulaires tumorales minoritaires présentant des mutations de *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1*, *ATM* ou *BIRC3* ont été identifiées en association au sein de la même tumeur avec une fraction cellulaire plus importante présentant d’autres mutations de ces mêmes gènes, ceci respectivement dans 4,9-13,4%, 5,9-9%, 6,7-9,7%, 2,2-3,2% et 0,5-7,5% des cas de LLC non traitées. Ces mêmes fractions tumorales minoritaires ont été retrouvées isolément, sans autre mutation clonale ou sous-clonale de ces mêmes gènes au sein de la masse tumorale dans respectivement 2,2-5,8%, 0,5-5,5%, 2,2-7,6%, 0,25-1,6% et 2,5-7,2% des cas de LLC non traités.⁽⁹²⁻⁹⁶⁾ Ceci représente un intérêt clinique, dans la mesure où il a été démontré que la présence de sous-clones minoritaires arborant des mutations de *TP53* sont associés avec le même pronostic défavorable que celui associé à la présence de clones majoritaires *TP53* mutés.⁽⁹³⁾ De plus, la présence de sous-clones minoritaires arborant une mutation de *SF3B1*, *NOTCH1*, *ATM* ou *BIRC3* est associée à une pathologie plus agressive, nécessitant de mettre en place un traitement plus rapidement, ainsi qu’à un raccourcissement de la survie globale.⁽⁹⁵⁾

L’identification et la surveillance de l’apparition de ces sous-clones à différentes échéances de la maladie montre qu’il existe différents modèles d’évolution entre les LLC non traitées et les LLC traitées. En effet, sous la pression de sélection des traitements, on observe dans la plupart des cas l’expansion des sous-clones minoritaires *TP53* mutés aux dépens des sous-clones majoritaires chimiosensibles, faisant d’eux les clones prépondérants à la rechute.^(93, 95, 97) En revanche, les sous-clones arborant des mutations de *SF3B1*, *NOTCH1*, *ATM* ou *BIRC3* semblent rester stables dans la plupart des cas.^(95, 96) Les études de l’évolution clonale dans le contexte des LLC non traitées ont apporté des résultats contradictoires, allant de l’absence d’évolution spontanée^(74, 92, 96) à la progression naturelle dans 38 à 44% des cas, les sous-clones arborant une mutation de *TP53* et *SF3B1* étant les plus à même de produire cette évolution spontanée.^(95, 98) Malheureusement, les rares études apportant des données longitudinales sont des patients non traités l’on fait sur un nombre limité de patients et avec des périodes de suivi réduites.

Objectif

Dans cette étude, notre objectif était d’explorer le cours naturel de l’évolution de l’architecture sous-clonale chez des patients de stade A de Binet non traités, en réalisant une étude longitudinale du statut mutationnel des cellules tumorales par séquençage haut débit, sur des échantillons prélevés à différentes échéances de la maladie.

Matériel et méthodes

Dr Julien BROSEUS

Le séquençage d'un total de 1088 échantillons a eu lieu à Ulm en 2018. Parmi eux, 810 échantillons ont été récoltés au diagnostic de LLC, 220 ont été récoltés au cours du suivi de la maladie, mais avant la mise en place d'un traitement et 58 ont été récoltés après traitement.

La méthode utilisée était une méthode de séquençage ciblée sur un set de 13 gènes choisi pour leur pertinence dans le contexte de la LLC : *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *ATM*, *MYD88*, *BIRC3*, *FBXW7*, *POT1*, *BCL2*, *EGR2*, *RPS15*, *BAX*, et *BTK*. La génération des librairies a été faite avec le kit Illumina TruSeq (Illumina, San Diego, CA, États-Unis d'Amérique) en utilisant 200 ng d'ADN de départ. Les oligonucléotides utilisés à titre de primers étaient distribués en 2 sets différents pour éviter les hybridations croisées. Chaque set permettait de générer 305 amplicons différents couvrant les principaux exons des gènes séquencés. Le séquençage lui-même a été réalisé sur automate Illumina MiSeq.

Dr Julien BROSEUS

5. PROJET DE RECHERCHE : GÉNOMIQUE DES HÉMOPATHIES MALIGNES

Appartenance à une structure de Recherche Labellisée Inserm

Fédération Hospitalo-Universitaire **ARRIMAGE** (*Digestive and OsteoARTicular Remodeling/Inflammation/Immunomodulation/Metabolism in diseased AGEing*).

Inserm U1256 N-GERE (Nutrition Génétique et Risques Environnementaux)

L'unité Inserm U1256 appartient à la Fédération Hospitalo-Universitaire « **ARRIMAGE** « Digestive and OsteoARTicular Remodeling/Inflammation/Immunomodulation/Metabolism in diseased AGEing ».

<http://arrimage.univ-lorraine.fr/inserm-u1256-lab/>

Contrat quinquennal 2018-2023 – Inserm U1256 N-GERE (Nutrition Génétique et Risques Environnementaux) - Équipe 3 « Métabolisme, Génomique Intégrative et Bio-informatique »

Résumé du projet :

L'objectif de l'équipe est d'élucider le rôle du métabolisme, d'identifier des biomarqueurs, de mieux comprendre la physiopathologie et de déterminer des cibles thérapeutiques par une approche de génomique intégrative, en particulier dans le domaine des cancers (groupe 1) et des pathologies métaboliques complexes (groupe 2).

Le groupe 1 travaille sur les hémopathies malignes lymphoïdes B : leucémie lymphoïde chronique, lymphomes B-diffus à grandes cellules, syndrome de Richter, lymphomes de la zone marginale, maladie de Waldenström.

Le groupe 2 travaille : (i) sur les liens entre le métabolisme des monocarbone et les modifications épigénétiques dans les mécanismes d'oncogénèse, avec un intérêt particulier pour les tumeurs cérébrales, les carcinomes pulmonaires, et les hémopathies malignes et (ii) sur l'identification des mécanismes et conséquences de la dépendance à la méthionine dans les cellules souches cancéreuses.

Nom	Prénom	Grade	Discipline
HOULGATTE	Rémi	DR Inserm, Responsable d'équipe	Génomique
GAUCHOTTE	Guillaume	PU-PH, Co-responsable d'équipe	Anatomo-pathologie
FEUGIER	Pierre	PU-PH	Hématologie
VIGNAUD	Jean-Michel	PU-PH	Anatomo-pathologie
NAMOUR	Farés	PU-PH	Biochimie
PERROT	Aurore	MCU-PH	Hématologie
BROSEUS	Julien	MCU-PH	Hématologie
LESEVE	Jean-François	PH	Hématologie
HERGALANT	Sébastien	Ingénieur d'Études (IE) Inserm	Bio-informatique

Tableau 13. Liste des membres de l'équipe 3 de l'unité Inserm U1256 (contrat quinquennal 2018-2023)

Mon objectif est de continuer mes travaux de recherche dans la thématique de la génomique structurale et fonctionnelle des hémopathies malignes, en continuant et en développant les collaborations locales (UMS2008 Ingénierie Biologie Santé en Lorraine ex FR3209 BMCT, Institut de Cancérologie de Lorraine), régionales (Professeur François GIRODON à Dijon), nationales (Professeur Catherine THIEBLEMONT à Saint-Louis, groupe FILO) et enfin internationales (Professeurs STILGENBAUER et SIEBERT à Ulm).

Dr Julien BROSEUS

5.1. Projet à court terme : Génomique intégrative des lymphomes B-diffus à Grandes Cellules (LBDGC) primitifs en rechute.

5.1.1. Étude génomique intégrative des LBDGC en rechute issus de l'étude CORAL

Objectif Identifier les réseaux de régulation perturbés dans les LBDGC en rechute

État du projet Pour 30 des 39 patients étudiés lors de mon travail de Thèse d'Université nous disposons aussi des données de transcriptomique acquises sur puces *Agilent Whole Human Genome Microarray 4x44K* (Agilent technologies, Santa Clara, CA, États-Unis d'Amérique) Le croisement des données de génotypage et des données de transcriptomique développé ici correspond au concept appelé *Genetical Genomics* (**Figure 11**).⁽⁹⁹⁻¹⁰²⁾

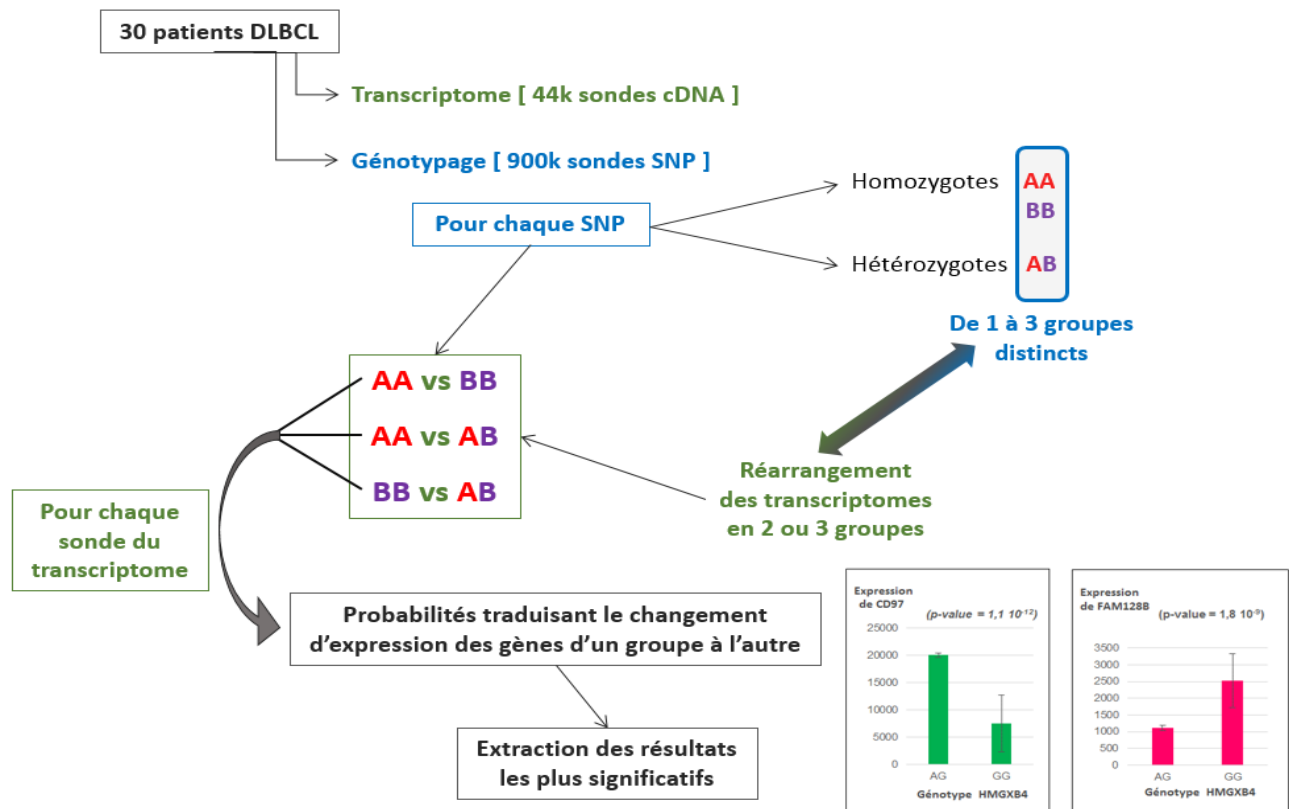


Figure 11. Projet d'étude génétique-génomique des lymphomes B-diffus à Grandes Cellules

5.1.2. Étude génomique des LBDGC en rechute en fonction des anomalies du gène MYC

Objectif Réaliser une étude génomique intégrative des LBDGC en rechute selon leur statut mutationnel MYC et reconstituer les réseaux de régulation perturbés.

État du projet Les données d'exome et de transcriptome sont disponibles pour 6 échantillons de LBDGC présentant une anomalie du gène MYC et de 6 échantillons de LBDGC ne présentant pas d'anomalie de ce gène.

5.2. Projet à moyen et à long terme : Génomique intégrative de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) et du Syndrome de Richter (SR)

5.2.1. La Leucémie lymphoïde chronique (LLC)

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) constitue la forme de leucémie la plus fréquente en Europe et en Amérique du Nord.⁽⁶³⁾ Bien qu'étant considérée comme une hémopathie lymphoïde B indolente, la LLC représente en réalité un ensemble très hétérogène du point de vue de l'évolution clinique, allant de la maladie non- ou peu évolutive à des formes agressives.⁽¹⁰³⁾

Le diagnostic de LLC est basé sur l'étude de la numération-formule sanguine, du frottis sanguin et par la caractérisation immunophénotypique des lymphocytes circulants par cytométrie en flux (CMF).^(65, 66) Le diagnostic de LLC requiert la présence d'au moins 5 G/L de lymphocytes B clonaux dans le sang périphérique. Cette clonalité est démontrée par CMF, par la mise en évidence d'une restriction monotypique des chaînes légères de surface sur les lymphocytes B. Sur le frottis sanguin, on observe une population monomorphe de petits lymphocytes sanguins matures, avec une couronne cytoplasmique étroite, une chromatine dense partiellement agrégée, dépourvue de nucléole. La présence d'ombres de Gumprecht fait partie du tableau. La présence de noyaux clivés peut être observée (LLC atypique au-delà de 15%), de même que la présence de prolymphocytes (dans la limite de 55%). Les cellules malignes co-expriment les marqueurs lymphocytaires B CD19, CD20 et CD23, ainsi que le marqueur lymphocytaire T CD5+. L'intensité d'expression des antigènes de surface CD20 et CD79 et des chaînes légères est faible. Le score de Matutes est constitué de 5 paramètres : (i) expression faible des chaînes légères de surface ; (ii) expression du CD5 ; (iii) expression du CD23 ; (iv) expression faible du CD79b ou du CD22 et (v) expression faible du FMC7. Une LLC typique est affirmée par un score d'au moins 4/5.⁽¹⁰⁴⁾

La LLC constitue en réalité un ensemble très hétérogène sur le plan pronostique. Plusieurs marqueurs sont prédictifs d'une faible survie en raison de l'expansion au cours de l'évolution de la maladie, d'un ou plusieurs sous-clones tumoraux résistants à l'immunochimiothérapie conventionnelle.^(69, 74, 76) La FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) interphasique permet l'identification d'anomalies cytogénétiques dans 80% des cas.⁽⁶⁹⁾ La recherche d'une délétion 17p13 par FISH est systématique car elle emporte le gène *TP53*, ce qui a pour conséquence une résistance aux analogues des purines et aux agents alkylants. La délétion monoallélique de *TP53* est associée à une mutation perte de fonction de l'autre allèle, réalisant une invalidation bi-allélique du gène.

La diversité combinatoire VDJ à l'origine des réarrangements du gène *IgHV* permet de générer un vaste répertoire de lymphocytes B tous différents, caractérisés par un BCR unique. Il a été démontré qu'un tiers des LLC présentaient un BCR stéréotypique, c'est-à-dire appartenant à un groupe commun à plusieurs patients, démontrant une probable sélection par l'antigène. Certains groupes de BCR stéréotypiques sont associés à un mauvais pronostic, comme par exemple le groupe VH3.⁽¹⁰⁵⁾

Les délétions des bras chromosomiques 17p ou 11q, les mutations de *TP53*, *ATM*, *NOTCH1* et *SF3B1*, et le statut mutationnel *IgHV* sont les facteurs de risque les plus pertinents.^(81, 106) Ces marqueurs pronostiques ont une influence démontrée sur la rapidité d'évolution de la maladie, le risque de rechute et le risque de transformation, mais ne sont pas pris en compte dans la décision thérapeutique. A ce jour, la mise en place d'un traitement et la nature de ce traitement reposent sur des critères clinico-biologiques simples et sur la présence ou non d'une délétion 17p13.

Dr Julien BROSEUS

A l'heure actuelle, l'immuno-chimiothérapie par Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide (RFC) est le traitement de référence en première intention chez les patients de moins de 65 ans et/ou en bon état général et atteints d'une LLC sans délétion 17p ni mutation de *TP53*.⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾ Les progrès scientifiques récents ont permis d'identifier les bases physiopathologiques de la LLC et l'avènement récent de traitements « chemo-free » ciblant les voies de signalisation qui sont à l'origine de la prolifération tumorale et de la résistance à l'apoptose.⁽¹¹⁰⁾

L'activation constitutive du BCR (*B-Cell Receptor*) est un des principaux mécanismes de résistance tumorale, entraînant une prolifération accrue et une résistance à l'apoptose.^(111, 112) Bloquer la transmission du signal du BCR constitue donc un moyen thérapeutique de choix. CAL 101 est un inhibiteur sélectif de l'isoforme p110δ de PI3K (PI3Kδ) et PCI-32765 est un inhibiteur spécifique de BTK (*Bruton Tyrosine Kinase*), un acteur clé de la transmission du signal du BCR. Ces molécules permettent (i) de restaurer l'apoptose dans les cellules malignes (ii) de forcer les cellules malignes à quitter leur environnement ganglionnaire, protecteur, d'origine.⁽¹¹³⁾ Les essais cliniques montrent d'excellents résultats dans le traitement des LLC réfractaires ou en rechute après l'immunochimiothérapie conventionnelle,⁽¹¹⁴⁾ mais aussi en traitement de première ligne.⁽¹¹⁵⁾

L'expression élevée de la protéine anti-apoptotique BCL-2 est un mécanisme de résistance tumoral classique dans la LLC. L'ABT-199 est un inhibiteur oral hautement spécifique de la protéine anti-apoptotique BCL-2. Il induit la mort cellulaire en reproduisant l'effet du domaine BH3 (effet « BH3-like »).⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾ Ce médicament a démontré une efficacité expérimentale impressionnante en traitement des LLC de haut risque et chimiorésistantes.⁽¹¹⁹⁾

Contrairement aux traitements conventionnels par chimiothérapie, ces nouveaux traitements ciblés de la LLC, ont pour objectif non pas de détruire l'ADN, mais de cibler les voies de signalisation cellulaire détournées par les cellules tumorales. Ils présentent donc moins de toxicités et ont l'intérêt d'être très bien tolérés par les malades âgés et/ou présentant des comorbidités. Il s'agit là d'un atout évident dans le contexte d'une maladie dont la médiane d'âge au diagnostic est de 72 ans.⁽¹¹⁵⁾

Pour autant, tous les patients ne répondent pas à ces nouveaux traitements ciblés et plusieurs cas de rechute malgré une première réponse ont été rapportés. Les mécanismes physiopathologiques de la LLC ne sont donc pas complètement élucidés et la question se pose aujourd'hui des mécanismes de résistance à ces nouvelles thérapies ciblées. Il existe peu de données sur les mécanismes de résistance tumorale à ces nouveaux agents. Certaines mutations des gènes BTK et PLCγ2 ont été associées à des mécanismes de résistance spécifiques à l'Ibrutinib.⁽¹²⁰⁾ Par ailleurs, la description récente de profils d'expression génique spécifiques et de caractéristiques épigénétiques particulières sont venues récemment compléter nos connaissances de la physiopathologie de la LLC et de ses mécanismes de résistance thérapeutique.⁽¹²¹⁻¹²⁵⁾

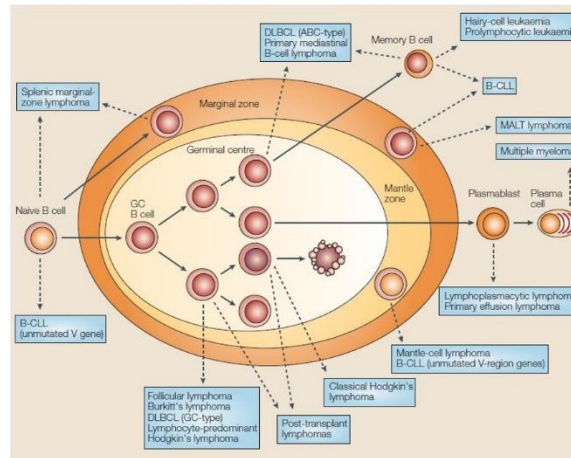
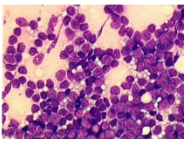
La transformation de la LLC en Syndrome de Richter (SR) concerne 2,3 à 9% des LLC. Le SR constitue une transformation en un lymphome de haut grade se présentant dans 90% des cas avec une histologie de lymphome B-diffus à grandes cellules (LBDGC). Dans plus de 90% des cas, le SR présente le profil immunohistochimique d'un LBDGC de phénotype « non-Germinal Center-like ».⁽¹²⁶⁻¹³²⁾

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) et les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC)

Lymphomes à petites cellules

- Réputés indolents
- Réputés peu évolutifs
- Surveillance
- Hétérogénéité importante
- Problématique de l'évolution tumorale en des formes histologiques plus agressives

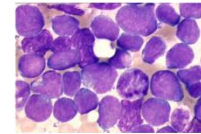
Exemple : la LLC



Lymphomes à grandes cellules

- Toujours agressifs
- Rapidement évolutifs
- Traitement systématique
- Hétérogénéité importante
- Problématique de la chimiorésistance

Exemple : le LBDGC



LLC : Leucémie Lymphoïde chronique
LBDGC : Lymphome B-Diffus à Grandes Cellules

Figure 12. Principes généraux concernant les lymphomes à petites cellules (exemple : la Leucémie Lymphoïde Chronique) et les lymphomes à grandes cellules (exemple : les lymphomes B-diffus à Grandes Cellules). La transformation d'un lymphome à petites cellules en un lymphome à grandes cellules constitue une évolution péjorative fréquente. D'après Küppers et al.

Sur le plan clinique, la transformation d'une LLC en SR s'accompagne généralement de signes généraux, de l'apparition de tuméfactions extra-ganglionnaires et/ou d'une adénopathie > 5 cm avec augmentation rapide du volume ganglionnaire.

L'incidence de la transformation de la LLC en SR est de 0,5 à 1% par an. Le taux de transformation est variable selon les séries, la durée de suivi et la réalisation systématique ou non de biopsies à but diagnostique dans des situations cliniques évocatrices de transformation. L'incidence cumulative est estimée à 2,1% à 5 ans et 4,8% à 10 ans, soit un risque de transformation de 0,5% par an. Selon les études, 2,3 à 9% des LLC se transforment en SR, mais la prévalence est sous-estimée car directement dépendante de la politique de réalisation des biopsies ganglionnaires.^(129, 131, 134)

En effet, le diagnostic de SR requiert une preuve histologique. Dans un contexte de LLC, il est recommandé de pratiquer une biopsie ganglionnaire en cas de : (i) présence d'une adénopathie > 5 cm, et/ou (ii) doublement de la taille d'une adénopathie en moins de 3 mois, et/ou (iii) apparition d'une lésion extra-ganglionnaire suspecte, et/ou (iv) apparition de symptômes B (fièvre, sueurs nocturnes) et/ou (v) élévation marquée des LDH (Lactate DesHydrogénases). La biopsie est en général réalisée sur un ganglion sélectionné par sa forte activité métabolique attestée par tomographie par émission de positons (TEP) couplée au scanner.⁽¹³⁴⁾

Cette politique est variable d'un centre à l'autre. Les prévalences les plus élevées sont retrouvées dans les centres pratiquant la biopsie ganglionnaire de manière systématique. Le chiffre réel est donc probablement proche de la fourchette haute de 9%.^(127, 128, 130, 131, 135)

Lorsqu'elle survient, la transformation d'une LLC en SR a lieu dans un délai court, dans la grande majorité des cas moins de 4 ans après le diagnostic initial. Le délai médian de survenue est de 23 mois. La survie médiane une fois la transformation en SR avérée est d'environ 12 mois.^(126-129, 131)

Dr Julien BROSEUS

Les facteurs prédictifs de transformation en SR identifiés ne sont pas utilisés en pratique clinique

Les études menées pour répondre à cette question offraient une période médiane de suivi d'environ 4 ans. Elles ont permis d'identifier des facteurs cliniques, biologiques et moléculaires significativement associés à un risque augmenté de transformation en SR.

Les principaux facteurs de risque cliniques sont : (i) une LLC de stade avancé au diagnostic et (ii) la présence d'une adénopathie > 3 cm. ^(128, 131)

Les facteurs de risque biologiques identifiés sont : (i) l'intensité de l'hyperlymphocytose sanguine, (ii) un taux élevé de $\beta 2$ microglobuline sérique, (iii) l'expression de ZAP70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) par le clone malin (seuil de positivité 20%), (iv) l'expression de CD38 par le clone malin (seuil de positivité 30%), (v) l'expression de CD49d par le clone malin. ^(128, 129, 131)

Enfin, les facteurs de risque moléculaires sont : (i) l'absence de délétion (13q14), (ii) l'existence d'anomalies génétiques de haut risque : délétions (11q22) et (17p13), (iii) un statut non-muté du gène *IgHV*, (vi) l'existence d'un BCR (*B-Cell Receptor*) stéréotypique, en particulier *IgHV*₄₋₃₉ (iv) l'existence de télomères courts < 5000 paires de bases (v) certains polymorphismes des gènes CD38, LRP4 (*low density lipoprotein receptor-related protein 4*) et BCL2 (*B-cell CLL / Lymphoma 2*), et (vi) les mutations de *NOTCH1*. ^(128, 129, 131, 135-141)

Certaines combinaisons d'anomalies débouchent systématiquement sur la transformation de la LLC en SR, comme la co-occurrence d'une mutation activatrice de *NOTCH1*, d'une trisomie 12 et d'un BCR stéréotypique de type *IgHV*₄₋₃₉. D'autres comme la combinaison d'une mutation de *SF3B1* et d'un BCR stéréotypique de type *IgHV*₃₋₂₁ entraîne un risque accru de transformation en SR. ^(128, 137, 139)

Le poids de chaque variable est difficile à évaluer car les séries de patients étudiées sont hétérogènes. En pratique, ces éléments ne sont pas utilisés pour évaluer le risque de transformation en SR. La surveillance est essentiellement clinique, avec pratique d'une biopsie ganglionnaire en cas de contexte évocateur de transformation.

L'influence du traitement de la LLC sur le risque de transformation en SR n'est pas établie.

Dans une étude de 2008 portant sur des patients atteints de LLC, 82/185 (44,3%) des malades ont été traités. Le nombre de lignes de traitement était très hétérogène dans la mesure où 36/82 malades (43,9%) ont bénéficié d'une seule ligne de traitement, 22/82 malades (26,8%) ont bénéficié de deux lignes de traitement et 25/82 (30,4%) malades ont bénéficié d'au moins 3 lignes de traitement. Les agents alkylants ont été proposés à une majorité de malades : 63/82 (76,8%). Les combinaisons contenant de la Fludarabine ont bénéficié à 47/82 (57,3%) des malades, les combinaisons contenant du Rituximab à 40/82 (48,7%) des malades, ou de l'Alemtuzumab : 11/82 (13,4%).⁽¹²⁸⁾

Cette étude illustre la grande hétérogénéité de prise en charge des malades, rendant très complexe l'attribution d'un risque accru de transformation à un traitement en particulier.

Une étude publiée en 2013 et portant sur 1641 malades a montré que la transformation survient dans la moitié des cas sur un terrain de LLC non traitée et dans l'autre moitié des cas sur une LLC traitée. Le traitement de la LLC est associé à un risque de transformation en SR de 1% par an (5% à 5 ans, 15,2% à 10 ans).

Les combinaisons d'analogues des purines, qui empêchent la réparation de l'Acide DesoxyriboNucléique (ADN), avec des agents alkylants, qui induisent des cassures de l'ADN, augmentent le risque de transformation à 1,5% par an. Mais l'utilisation des différentes molécules en monothérapie (analogue des purines, agent alkylant ou immunothérapie) n'augmente pas le risque de transformation en SR.⁽¹³¹⁾

L'impact de la chimiothérapie conventionnelle sur le risque de transformation en SR reste controversé car ce risque est équivalent avec un traitement par Fludarabine seule, par Chlorambucil seul ou par une combinaison des deux.⁽¹⁴²⁾

De même, après une période médiane de suivi de 3,5 ans, le risque de transformation en SR était équivalent avec un traitement par Chlorambucil seul, Fludarabine seule ou par une combinaison Fludarabine + Cyclophosphamide.⁽¹⁴³⁾

A l'heure actuelle, la combinaison Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide (RFC) est le traitement de référence en première intention chez les patients en bon état général et atteints d'une LLC dont le clone tumoral ne présente pas de délétion 17p.⁽¹⁰⁷⁾

Au stade de LLC, la relation entre (i) les caractéristiques biologiques du clone malin, (ii) l'ancienneté de la maladie, (iii) la nature des traitements entrepris pour soigner la LLC et (iv) le risque de développement d'un SR, est mal comprise. Il s'agit pourtant d'un point capital car la capacité à prévoir un risque de transformation en SR dès le stade de LLC permettrait de proposer aux malades concernés une prise en charge adaptée et de leur offrir une meilleure survie.

5.2.2. Le syndrome de Richter (SR)

Nous nous intéressons ici exclusivement à la forme histologique « LBDGC » du SR et non à son variant Hodgkinien. Le SR est un LBDGC secondaire constituant une évolution dramatique de 2,3 à 9% des LLC. Le SR est particulièrement agressif, conjuguant forte évolutivité tumorale et chimiorésistance. La survie est plus faible que dans les LBDGC primitifs, même si l'on considère le sous-type « *activated B-cell like* », qui est celui de plus mauvais pronostic. Ces observations indiquent une pathogénèse différente dans le SR.⁽¹²⁶⁻¹³¹⁾

Les caractéristiques moléculaires du SR sont peu connues et les données établies ne permettent pas une caractérisation physiopathologique précise ni la conception de nouvelles molécules thérapeutiques efficaces. Les anomalies identifiées à ce jour affectent les « régulateurs généraux » de la vie cellulaire. Dans le modèle moléculaire actuel, l'évolution du clone LLC en SR est associée à des dérégulations de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et du cycle cellulaire, principalement en raison d'anomalies de *TP53*, *NOTCH1*, *MYC* et *CDKN2A*.^(144, 145)

Contrairement aux LBDGC primitifs, dont la pathogénie moléculaire est très bien connue, on ne connaît pas à l'heure actuelle de « lésion(s) moléculaire(s) » unique(s) ou combinée(s), ni de mise en jeu constitutive d'une ou plusieurs voie(s) d'activation cellulaire(s) pouvant être responsable(s) de la transformation en SR ou de l'agressivité particulière de cette maladie.

Au stade de la transformation, les facteurs pronostiques sont essentiellement cliniques et ont été déterminés à partir d'études anciennes.

Le SR est un LBDGC secondaire constituant une évolution dramatique de la LLC, de par son agressivité particulière, conjuguant forte évolutivité tumorale et chimiorésistance.⁽¹²⁹⁾ La survie est plus faible que dans les LBDGC de novo / primitif, même si l'on considère le sous-type « *activated B-cell like* », qui est celui de plus mauvais pronostic. Ces observations indiquent une pathogénèse différente dans le SR.

La survie médiane une fois la transformation en SR avérée est de 5 à 24 mois selon les études. Les causes de décès sont dans l'ordre décroissant de fréquence : la progression de la maladie, les complications infectieuses dues au traitement et les causes non reliées à la maladie ou à son traitement.⁽¹²⁶⁻¹³¹⁾

Il n'existe pas d'étude randomisée comparant différentes approches thérapeutiques dans le SR mais plusieurs études ont testé chacune un traitement spécifique. Le protocole de première ligne le plus répandu est le R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicine, Oncovin, Prednisone), qui permet, lorsqu'il peut être proposé, d'obtenir une médiane de survie de 15 mois.^(134, 146) Des protocoles de chimiothérapie plus intensifs type OFAR (Oxiplatine, Fludarabine, Aracytine, Rituximab) n'ont permis d'obtenir qu'un taux de réponses complètes à 6,5% et une médiane de survie de 6 à 8 mois.^(147, 148) Compte-tenu de l'efficacité des analogues des purines dans la LLC, la combinaison associant la Fludarabine et la Cytarabine avec le Cyclophosphamide et le Cisplatine a été utilisée mais n'a permis d'obtenir que 5% de réponses, ceci au prix d'une très forte toxicité et de nombreux effets secondaires.⁽¹³⁴⁾

Ces protocoles de première ligne permettent dans 10 à 15% des cas d'obtenir une réponse partielle ou une réponse complète, mais de courte durée, n'offrant qu'une médiane de survie de 12 mois (27% de survie à 3 ans). La consolidation par une auto- ou une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez un petit nombre de patients sélectionnés par leur réponse à la chimiothérapie permet d'obtenir une survie plus longue, de l'ordre de 75% à 3 ans.^(127, 149) Les nouvelles approches thérapeutiques, en particulier l'utilisation de l'Ibrutinib, un inhibiteur de la Bruton tyrosine kinase (BTK), sur un petit groupe de patients montrent des résultats encourageants.⁽¹⁵⁰⁾ Il existe toutefois peu de données et il est difficile de tirer des conclusions quant à l'efficacité de ces traitements, par ailleurs de plus en plus utilisés au stade LLC.

Dr Julien BROSEUS

Les caractéristiques moléculaires du SR sont peu connues et les données établies ne permettent pas une caractérisation physiopathologique précise ni la conception de nouvelles molécules thérapeutiques efficaces. Les anomalies identifiées à ce jour affectent les « régulateurs généraux » de la vie cellulaire. Dans le modèle moléculaire actuel, l'évolution du clone LLC en SR est associée à des dérégulations de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et du cycle cellulaire, principalement en raison d'anomalies de *TP53*, *NOTCH1*, *MYC* et *CDKN2A*.⁽¹⁴⁵⁾

L'étude publiée en 2006 par Tsimberidou et al. a montré la grande hétérogénéité de prise en charge des patients atteints de SR. Dans cette étude, les patients ont été traités avec des chimiothérapies classiquement utilisées dans le cadre des lymphomes agressifs et dans le cadre des leucémies aiguës lymphoblastiques. Parmi les 130 patients traités, 79/130 (60%) l'ont été par chimiothérapie seule, 47/130 (36%) par immunothérapie + chimiothérapie et 4% par immunothérapie seule. Cette étude a permis de bâtir un score pronostique clinico-biologique pour évaluer la survie chez les patients atteints de SR et traités par chimiothérapie ou immuno-chimiothérapie. Ce score repose sur 5 critères, chacun valant un point : (i) le statut de performance selon l'ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) > 1, (ii) un taux de LDH > 1,5 fois la valeur haute du taux normal, (iii) une numération plaquettaire < 100 G/L, (iv) une taille tumorale > 5 cm, (v) une LLC traitée par au moins deux lignes de chimiothérapie. Cette étude a défini 4 groupes de risque dont la survie médiane varie de 1 mois pour les patients à haut risque (4 ou 5 points) à 13 mois pour les patients de faible risque (0 ou 1 point).⁽¹²⁷⁾ L'intérêt de ce score pronostique a été confirmé ensuite par deux études indépendantes.^(129, 131)

En 2011, un autre score pronostique a été proposé. Ce score est fondé sur trois facteurs de risque identifiés par analyse multivariée : la présence d'une anomalie de *TP53*, un indice de performance faible selon l'ECOG, et une mauvaise réponse post-traitement. Après 4 ans de suivi, la survie médiane des patients de faible risque n'était pas atteinte, celle des patients de risque intermédiaire était de 2,1 ans et celle des patients de haut risque de 6 mois.⁽¹²⁹⁾

Les options thérapeutiques sont limitées. Il n'existe pas de traitement de référence efficace du syndrome de Richter et les scores pronostiques couramment admis reposent sur des critères cliniques et biologiques ne permettant pas d'établir avec précision la probabilité de survie. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'œuvre est indispensable pour pouvoir appréhender la complexité de cette pathologie.

Dr Julien BROSEUS

Les caractéristiques moléculaires des SR sont peu connues.

L'analyse de la relation clonale entre le clone LLC et le clone transformé en SR est fondée sur l'étude du réarrangement du gène *IgH VDJ CDR3*. En cas de relation clonale, la séquence *IgH VDJ* sera identique au stade de LLC et au stade de SR.⁽¹³⁷⁾ Selon les études, 80 à 90% des SR présentent un réarrangement *IgH VDJ CDR3* correspondant à celui identifié chez le clone LLC initial, signant une filiation et donc une évolution linéaire du clone malin. Ces SR présentent une médiane de survie de 14,2 mois et sont considérés comme les « véritables SR ». A l'opposé, les 10 à 20% de SR ne présentant pas de relation clonale avec la LLC initiale ont une médiane de survie très proche de celle des LBDGC *de novo* / primitifs (62,5 mois) et sont considérés par la plupart des auteurs comme des néoplasies indépendantes.⁽¹²⁸⁻¹³⁰⁾ La notion de relation clonale entre le clone LLC et le clone transformé est une dimension essentielle à l'heure actuelle. La relation clonale est considérée comme le facteur pronostique le plus probant et la vérification de la relation clonale LLC/SR, pourtant non réalisée en pratique courante, doit être encouragée.⁽¹³⁵⁾

Les anomalies de *TP53*, qu'il s'agisse de délétions partielles ou totales du gène ou de mutations perte de fonction, sont présentes dans 50 à 60% des cas de SR et sont acquises durant la transformation dans la majorité des cas.⁽¹²⁹⁾ La forte proportion de ces anomalies au stade de SR pourrait être due à un avantage de sélection clonale et une chimiorésistance conférés par ces anomalies.

Dans 50% des cas de SR, on retrouve un BCR stéréotypique, *IgHV*₄₋₃₉ notamment, c'est-à-dire une situation où une part importante des lymphocytes B exprime le même récepteur à l'antigène, indiquant une répartition non aléatoire, probablement en raison d'une stimulation antigénique chronique.⁽¹³⁷⁾

La voie NOTCH1 est une voie d'activation cellulaire menant à la mise en jeu de la forme active de NOTCH1 puis à la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Les mutations situées au sein de l'exon 34 entraînent la synthèse d'une protéine dépourvue de son domaine de dégradation PEST. Il s'agit donc d'une mutation gain de fonction entraînant le maintien de la forme activée de NOTCH1 et donc une croissance cellulaire incontrôlée. Les mutations activatrices de *NOTCH1* sont identifiées dans 30% à 40% des cas de SR.⁽⁸⁴⁾ La trisomie 12 est présente dans 30% des SR et est fréquemment associée à des mutations de *NOTCH1*.

Les anomalies de *C-MYC*, qu'il s'agisse de translocations ou d'amplifications du gène, concernent 25 à 30% des SR et sont acquises à la transformation dans 75% des cas. Ces anomalies de *C-MYC* sont couplées à des anomalies de *TP53* dans 50% des cas.^(129, 144)

L'étude du polymorphisme génétique sur un groupe de 13 SR dont 8 étaient couplés au clone LLC initial a permis d'identifier des anomalies de *miR 17-92*, un cluster de micro-ARN régulant l'expression de *C-MYC*. Ces anomalies sont acquises au stade de la transformation.⁽¹⁵¹⁾

L'étude des délétions et duplications géniques par *CGH-array* (*Comparative Genomic Hybridization*) a permis d'identifier des délétions 9p21 dans 30% des cas de SR. Ces délétions sont systématiquement acquises à ce stade et incluent le gène *CDKN2A*, codant pour un régulateur du cycle cellulaire. Ces anomalies sont bi-alléliques dans un tiers des cas. Cette étude a confirmé la grande proportion d'évolutions linéaires du clone LLC et l'acquisition d'une moyenne de 22 anomalies nouvelles entre le stade LLC et le stade SR.⁽¹⁵²⁾ La complexité génomique du SR est intermédiaire entre celle de la LLC et celle des LBDGC *de novo*/primitifs.⁽¹⁴⁴⁾

Enfin, le séquençage d'exome montre que les anomalies identifiées dans les LBDGC *de novo* / primitif ne sont quasiment pas retrouvées dans le SR à l'exception des anomalies de *CARD11*, *MYD88*, *CDKN2A/B* et *C-MYC*.^(139, 144, 151) De manière surprenante, 64,7% des SR présentent un profil non-muté du gène codant pour la partie variable des chaînes lourdes d'immunoglobuline alors que tous les LBDGC *de novo* / primitif présentent

Dr Julien BROSEUS

un profil muté pour ce gène. SR et LBDGC de novo/primitif sont donc comparables morphologiquement mais très différents sur le plan génétique.

L'analyse des profils de méthylation des promoteurs géniques montre une différence de profil de méthylation génique entre SR et LBDGC primitif, ainsi qu'une hyperméthylation de promoteurs de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, en particulier *TP53*, *RBI* et *CDKN2A*, dans le SR.⁽¹⁵³⁾

Les principales anomalies décrites sont l'inactivation de *TP53*, les anomalies de *C-MYC*, la présence de certains BCR stéréotypiques, les mutations de *NOTCH1* et les délétions de *CDKN2A/B*. Le panorama génétique du SR ne présente que peu d'anomalies communes avec les LBDGC primitifs. Ainsi, le développement d'un SR ne peut être expliqué par l'existence des anomalies génétiques classiquement associées aux LLC et aux LBDGC primitifs.

La découverte progressive de facteurs de risque de transformation en SR devrait permettre l'identification des patients à haut risque et la mise en place d'une surveillance accrue pour faire le diagnostic de SR le plus tôt possible, un délai diagnostique long étant de mauvais pronostic.

Modèle moléculaire actuel

Les anomalies identifiées à ce jour affectent les « régulateurs généraux » de la vie cellulaire. Dans le modèle moléculaire actuel, l'évolution du clone LLC en SR est associée à des dérégulations de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et du cycle cellulaire, principalement en raison d'anomalies de *TP53*, *NOTCH1*, *C-MYC* et *CDKN2A*. Seuls 10% des RS ne présentent aucune de ces 4 anomalies. 50% des cas de transformation en SR sont associés à l'acquisition d'une inactivation de *TP53*, d'une activation de *C-MYC* ou d'une délétion de *CDKN2A*. Dans 30% des cas, la transformation est associée à une trisomie 12 et une mutation de *NOTCH1* et ces anomalies sont mutuellement exclusives avec les inactivations de *TP53* ou *CDKN2A*. Les 20% des transformations restantes sont associées à d'autres anomalies génétiques (**Figure 13**).^(134, 144, 145, 152)

Contrairement aux LBDGC *de novo* / primitifs, dont la pathogénie moléculaire est très bien connue, on ne connaît pas à l'heure actuelle de « lésion(s) moléculaire(s) » unique(s) ou combinée(s), ni de mise en jeu constitutive d'une ou plusieurs voie(s) d'activation cellulaire(s) pouvant être responsable(s) de la transformation en SR ou de l'agressivité particulière de cette maladie.

Dr Julien BROSEUS

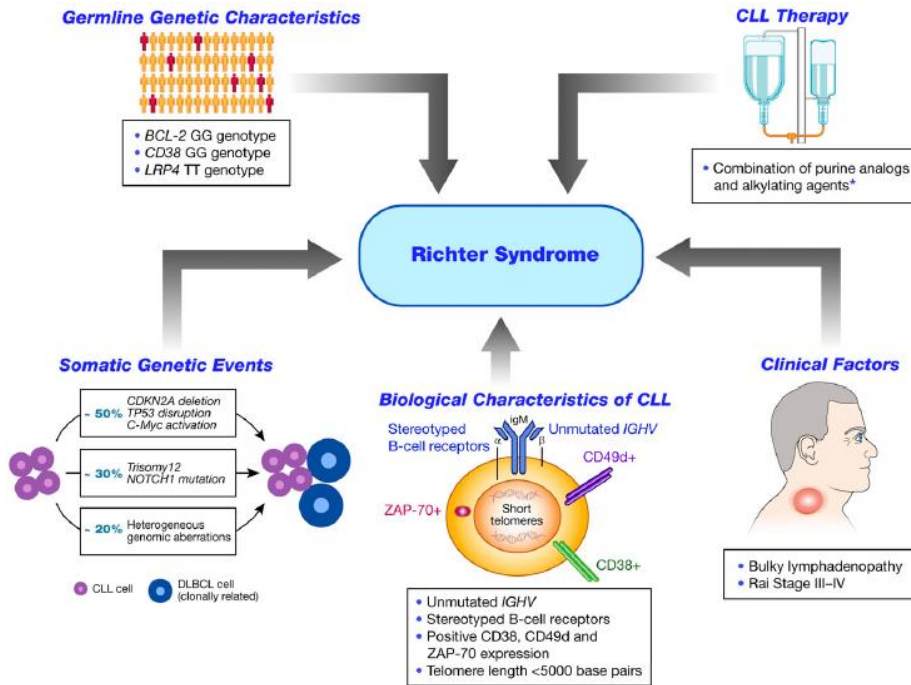


Figure 13. Les déterminants de la transformation de la LLC en SR. D'après Parikh et al.

Aucune de ces anomalies ne peut définir un SR, que ce soit à elle-seule ou sous forme combinée. Les bases moléculaires du développement du SR sont donc très méconnues. Une meilleure connaissance de ces mécanismes permettrait le développement de molécules thérapeutiques efficaces.

5.2.3. Étude de l'évolution tumorale de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en syndrome de Richter (SR)

L'évolution d'une LLC en SR survient dans un délai court, dans la grande majorité des cas inférieur à 4 ans. De plus les études menées sur des périodes de recrutement longues, parfois supérieures à 10 ans, ont montré qu'il n'existait pas de transformation au-delà de 82 mois. Malgré des survies de plusieurs années obtenues chez une petite population de patients bon répondeurs à la chimiothérapie et ayant pu bénéficier d'une autogreffe ou d'une allogreffe avec conditionnement atténué, le pronostic du SR demeure très sombre. Le SR est souvent diagnostiqué à un stade avancé, rendant d'autant plus difficile l'obtention d'une réponse prolongée. Une meilleure connaissance des déterminants de la transformation en SR dès le stade de LLC permettrait d'adopter une politique de surveillance plus intensive chez les malades à haut risque de transformation et de faire le diagnostic de SR plus tôt.^(128, 135)

L'analyse de l'exome de prélèvements séquentiels LLC puis SR pour 9 patients a mis en évidence une évolution tumorale entre le stade LLC et le stade Richter, avec en moyenne 22 anomalies nouvelles (CNV, mutations ponctuelles) entre les 2 stades.⁽¹⁵²⁾ Toutefois, cette série était limitée et ne permettait pas de déterminer l'influence du type de traitement de la LLC sur l'évolution tumorale. De plus, cette série ne permettait pas de comparer l'architecture tumorale (ensemble des sous-clones présents) aux différents stades de la maladie, car au stade LLC, seules les cellules du sang périphérique ont été prélevées. Nous disposons à ce jour de 7 séries de prélèvements ganglionnaires (LLC et SR) pour 7 patients, ce qui permet une telle étude de l'évolution de l'architecture tumorale. Nous sommes actuellement entrain de recenser auprès du groupe FILO, les cas similaires pour constituer une série plus importante.

Dans la mesure où nos collègues du *Broad Institute* (Professeur WU, Professeur GUIEZE) et d'Ulm (Professeur STILGENBAUER) ont commencé un travail équivalent et réuni une cohorte plus importante que la notre, nous avons opté pour une collaboration avec eux et leur avons fourni les 14 exomes relatifs aux 7 paires LLC-SR que nous avons réunies. Les analyses sont en cours au Broad Institute et ont fait l'objet d'un abstract soumis pour le congrès 2020 de l'ASH.

Dr Julien BROSÉUS

Notre hypothèse est que les déterminants génétiques de la transformation en SR sont présents dès le diagnostic de LLC. Une étude par séquençage de l'ADN nous permettra d'identifier les anomalies caractéristiques des futures LLC transformées. La connaissance des déterminants de la transformation dès le stade de LLC permettrait de proposer aux malades concernés une surveillance adaptée, de faire le diagnostic de transformation plus tôt et d'offrir aux malades une meilleure survie (**Figure 14**).

Recherche des déterminants de la transformation de la LLC en Syndrome de Richter

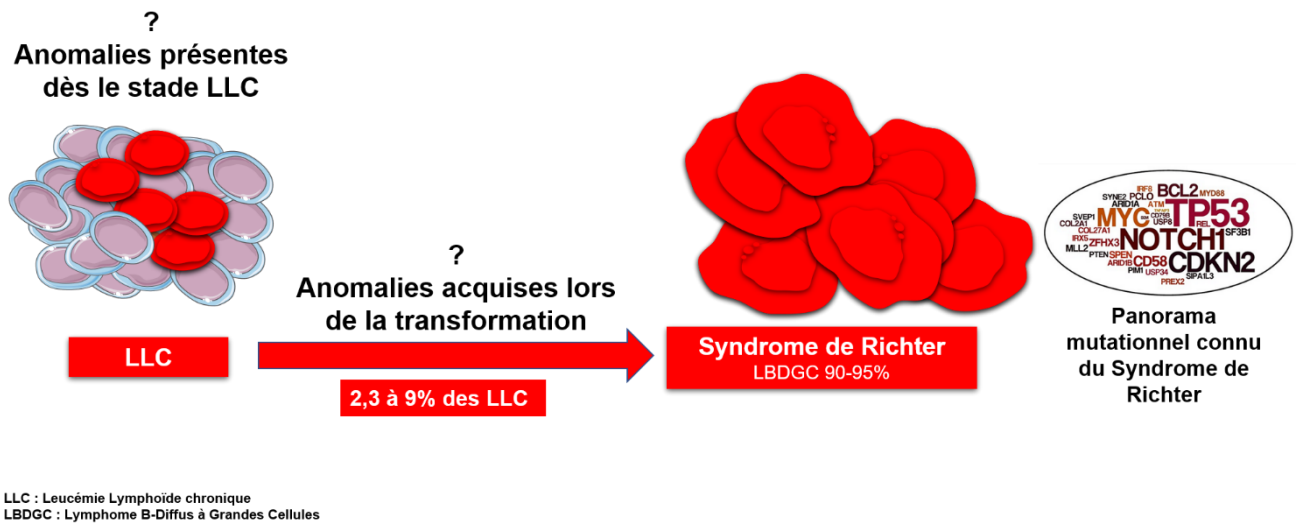


Figure 14. Présentation du projet de recherche des déterminants de la transformation de la LLC en Syndrome de Richter.

Synthèse

Objectifs	Etudier l'évolution tumorale entre le stade LLC et le stade Richter
Partenaires	Groupe FILO (<i>French Innovative Leukemia Organization</i>) Groupe du Pr Catherine WU et du Pr Romain GUIEZE (Boston) Groupe du Pr Stephan STILGENBAUER (UIm)
Financements	Inserm U954/U1256 : 12 000 euros Ligue contre le Cancer : 10 000 euros (Julien BROSÉUS, Pierre FEUGIER)
Etudiante M2	Christine MANENQ (2016-2017)
État du projet	Pour chacun des 7 patients recrutés (études du groupe FILO, CHRU de Nancy, CHRU d'Avicenne), nous disposons d'un échantillon d'ADN à la fois au stade LLC et au stade Richter. Le séquençage de l'exome a été réalisé à Nancy, pour les 14 échantillons disponibles. Nos partenaires Américains et Allemands ont réuni dans le même temps une cohorte de plus de 50 paires LLC-Richter. Dans ce contexte, nous avons choisi d'unir nos efforts aux leurs pour consolider un grand effectif d'échantillons. L'analyse est en cours au <i>Broad Institute</i> à Cambridge, MA, USA.

Dr Julien BROSEUS

Abstract soumis pour le congrès 2020 de l'Association Américaine d'Hématologie.**Genetic determinants and evolutionary history of Richter syndrome**

*Erin M Parry MD PhD**, *Romain Guieze MD**, *Ignaty Leshchiner PhD**, *Daniel Rosebrock*, *Bria Persaud*, *Camilla Lemvigh*, *Eugen Tausch*, *Matt Davids MD*, *Liudmilla Elagina*, *Amaro Taylor-Weiner PhD*, *Nitin Jain MD*, *William Wierda MD PhD*, *Laura Z Rassenti PhD*, *Thomas J Kipps MD PhD*, *Julien Broseus MD, PhD*, *Florence Cymbalista MD PhD*, *Neil Kay MD*, *Kenneth J. Livak PhD*, *Shuqiang Li PhD*, *Teddy Huang*, *Noelia Purroy-Zuriguél MD PhD*, *Annabelle J Anandappa MD*, *Stacey Fernandes*, *Laxmi Parida PhD*, *Filippo Utro PhD*, *Khan Rhrissorrakrai PhD*, *Chaya Levovitz MD PhD*, *Brian P. Danysh PhD*, *Kara Slowik*, *Sameer Parikh MD*, *Jennifer Brown MD PhD*, *Donna Neuberg ScD*, *Stephan Stilgenbauer MD***, *Gad Getz PhD ***, *Catherine J. Wu MD ***

*= *These authors contributed equally (co-first)*

**= *These authors contributed equally (co-last)*

Richter's syndrome (RS) arising from chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a striking example of an aggressive malignant histology that emerges from indolent cancer. A major barrier to disease control in CLL, RS is associated with poor clinical outcomes and limited survival. The genetic basis of RS is poorly understood and its relationship to antecedent CLL remains incompletely characterized. Notable challenges to the genomic study of RS includes those of sample acquisition, the distinction between true tumor events rather than sequence artifacts in archival fixed tissue, and the limitations of available computational techniques for deconvoluting admixtures of CLL and RS DNA within the same biopsy specimen.

To address these challenges and characterize the genetic profile of RS, we performed whole-exome sequencing (WES) on samples collected from 42 patients with RS of DLBCL histology. For this genomic characterization, samples from 37 patients were analyzed as 'trios' (matched germline, CLL and RS tissue DNA) and those from 5 as 'duos' (matched CLL and RS DNA). CLL diagnosis preceded RS diagnosis by a median of 1844 days (range 2-7136). The median number of prior CLL-directed therapies was 2 (range 0-10). 8 patients had no prior CLL-directed therapy, while 6 were exposed to novel agents. The median time from most proximal CLL sampling to RS was 81.5 days (range: 2502 days pre- to 114 days post RS diagnosis). Critical analytic innovations applied to this dataset included addressing contamination of CLL DNA in the germline sample (through the tool DeTIN) and generating the ability to discriminate between clones arising from RS or from CLL, even while both histologies were commonly co-existing within originating biopsies (via the tool PhylogicNDT).

From this discovery cohort of 42 cases, 36 (86%) revealed RS and CLL to be clonally-related based on WES analysis, with a distinct RS clone emerging from an existing CLL subclone. Of the 6 (14%) cases determined to be clonally unrelated by WES, 4 had been previously examined by IGHV sequencing; only 1 of 4 was categorized as clonally unrelated, likely due to CLL and RT admixture. RS displayed mutational signatures reflecting aging (CpG), canonical AID, and non-canonical AID processes. Through deconvoluting clonal composition using PhylogicNDT in related sample trios (n=31), we established several notable differences compared to antecedent CLL. First, RS clones presented higher rates of additional mutations than the ancestral CLL clones from which they developed (2.47 vs. 0.86 Mut/Mb, $p < 0.0001$). Second, the frequency of CLL-associated driver mutations in the RS clones was altered: TP53 mutation (n=21 (50%)), NOTCH1 mutation (n=17, 40%) NFKBIE (n=5, 12%), EGR2 (n=7, 14%), XPO1 (n=5, 12%), and RPS15 (n=3, 7%). Third, the clonal transition to RS was marked by a diversity of additional driver mutations and particularly in

Dr Julien BROSEUS

increased copy number variants (CNVs). RS biopsies had recurrent arm level events, including del(17p) in 39%, del(9p) in 9%, del(9q) in 7%, tri(12) in 18% and amp(19p) in 13% ($Q < 0.05$, GISTIC). The top focal alterations in RS biopsies, as identified by tool GISTIC included (q value ≤ 0.05): amp(1p36) – PAX7, amp(8q24), amp(7q11), amp(16p13), amp(19p13), del(8p21), del(19q13), del(17p13) – TP53, del(11q23) – BIRC3 and ATM, del(9q21) – PAX5, and del(10q26). Finally, whole genome doubling was observed in 6 cases upon transition to RS.

To further investigate RS and CLL clonal evolution at high resolution, we performed single-cell RNA-sequencing (10x Genomics), on biopsies at the time of RS diagnosis in 5 individuals with clonally related transformation. Data analysis and clustering was conducted using Seurat (v3) with doublet removal (DoubletFinder). We identified CNV in single-cell transcriptomes that matched the WES copy-number profiles of individual subclones of the RS and CLL populations and thus linked subclones identified by WES to single-cell expression clusters and states, revealing CLL, RS and intermediate evolutionary cell states.

In conclusion, we identify that RS arises from CLL subclones through distinct mutational trajectories. Further molecular subclassification of RS, including genetic characterization of additional cases, and linking mutational data with clinical outcomes is ongoing and has potential to alter clinical classification and prognostication of RS.

Dr Julien BROSEUS

5.3. Projet à moyen et à long terme : Étude Génomique et Protéomique du Syndrome de Richter

Le projet CGPSR (Caractérisation Génomique et Protéomique du Syndrome de Richter) est un projet d'étude multi-omique des mécanismes de la transformation de la LLC en syndrome de Richter et de la physiopathologie du Syndrome de Richter lui-même. Les deux investigateurs coordonnateurs sont le Docteur BROSEUS et le Professeur FEUGIER. Ce projet est porté par le CHRU de Nancy.

Grâce à ce support institutionnel fort, nous avons pu réunir à Nancy une grande biocollecion française sous l'égide du groupe Français d'étude de la LLC et du Syndrome de Richter : le FILO (*French Innovative Leukemia Organization*).

Enfin, cette étude repose sur des partenariats techniques et scientifiques locaux (CRB Lorrain, Inserm, CNRS, Université de Lorraine), régionaux (IGBMC et Intitut Hubert CURIEN à Strasbourg) et internationaux construits durant la mobilité internationale du Dr BROSEUS (Ulm en Allemagne, Consortium européen ICGC, *Broad Institute*).

Il s'agit d'un des deux piliers du projet scientifique présenté pour les 10 ans à venir (Figure 15).

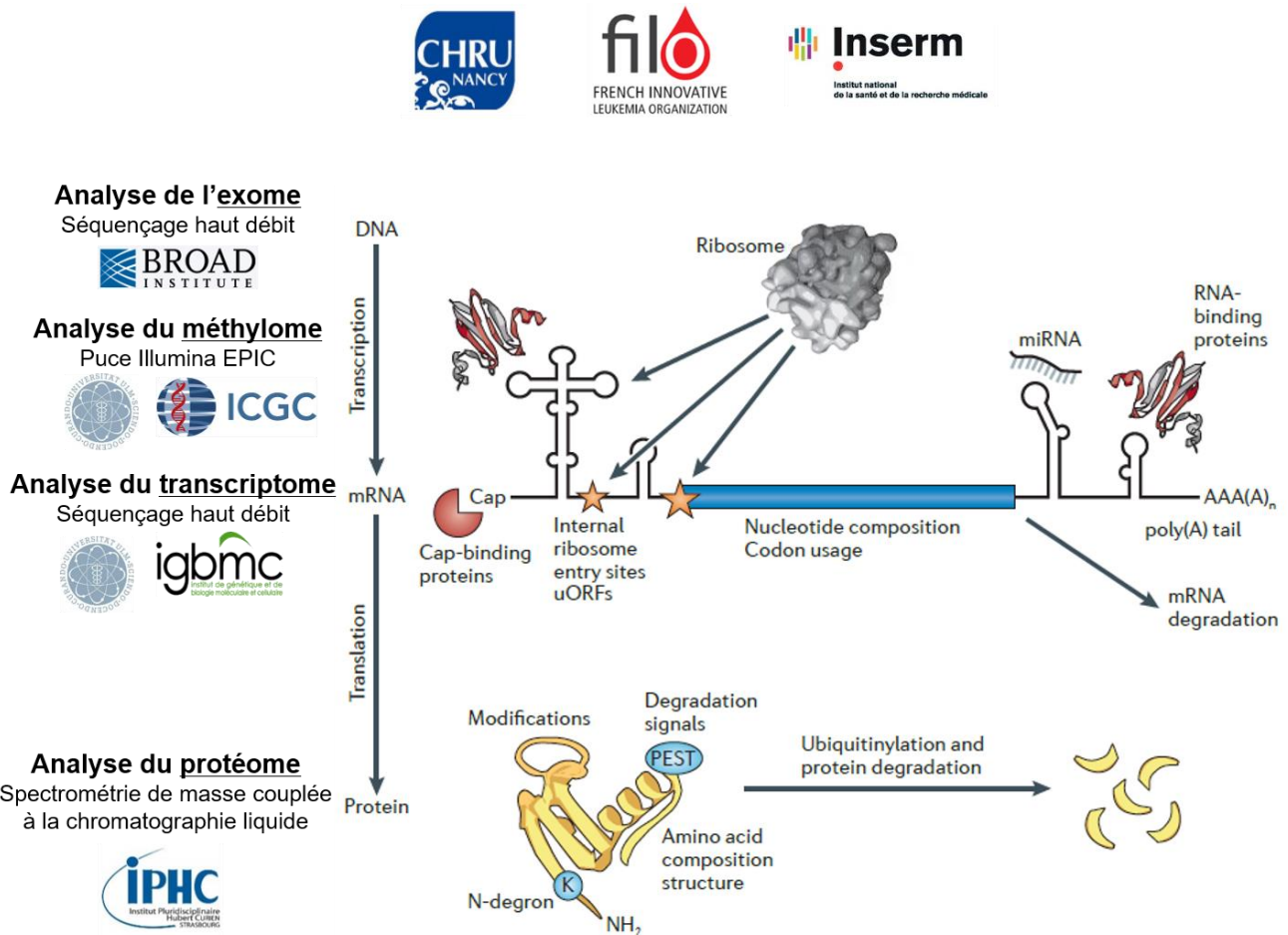


Figure 15. Représentation globale du projet CGPSR (Caractérisation Génomique et Protéomique du Syndrome de Richter, porté par le CHRU de Nancy, sous l'égide du groupe FILO et en partenariat avec l'Unité Inserm U1256. Les différents partenaires académiques, Français Allemands et Américains sont représenté pour chaque volet du projet. D'après Vogel et al.

5.3.1. Étude du méthylome du syndrome de Richter

L'analyse des profils de méthylation des promoteurs géniques montre une différence de profil de méthylation génique entre SR et LBDGC *de novo* / primitif, ainsi qu'une hyperméthylation de promoteurs de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, en particulier *TP53*, *RBI* et *CDKN2A*, dans le SR.⁽¹⁵³⁾ Toutefois, cette étude ne présentait pas une étude concomitante du transcriptome.

La dérégulation de la méthylation de l'ADN est l'un des principaux mécanismes de tumorigenèse dans les tumeurs malignes hématologiques. Le *silencing* des gènes suppresseurs de tumeurs et la surexpression des oncogènes sont liés à différentes modifications de la méthylation de CpG dans les régions promotrices proximales, dans les *enhancers* distaux ou dans le corps des gènes. Dans ce contexte de modifications complexes des schémas de méthylation de l'ADN à l'échelle du génome, il est essentiel d'identifier les modifications liées au développement normal de la lignée cellulaire et celles liées à l'apparition de la maladie. Des études fondatrices ont exploré les modèles de méthylation tout au long du développement normal des cellules B, dévoilant la dynamique du panorama de méthylation de la lymphopoïèse B.^(121, 125, 154) Ces études ont permis de mieux comprendre les signatures des profils de méthylation liés à la cellule d'origine des tumeurs malignes des cellules B, ainsi que l'identification des modifications des profils de méthylation liées aux mécanismes de transformation tumorale, dans le contexte de la LLC,^(123, 132) lymphome folliculaire et de Burkitt⁽¹⁵⁵⁾ et lymphome à cellules du manteau.⁽¹⁵⁶⁾

L'étude du méthylome renseigne sur un des mécanismes de régulation de l'expression des gènes. Une étude intégrative avec les données du transcriptome, acquises sur les mêmes échantillons, permet de mesurer les conséquences des modifications du méthylome sur le niveau d'expression de l'ensemble des gènes et d'identifier les réseaux de régulation dérégulés.⁽¹⁵⁷⁾

Nous avons bâti une étude nationale qui a réuni 96 échantillons Richter et LLC en France dont le profil de méthylation sera comparé à une grande base de données européenne, et qui bénéficie de l'expertise de leaders européens dans ce domaine Consortium ICGC (*International Cancer Genome Consortium*) (**Figure 16**).

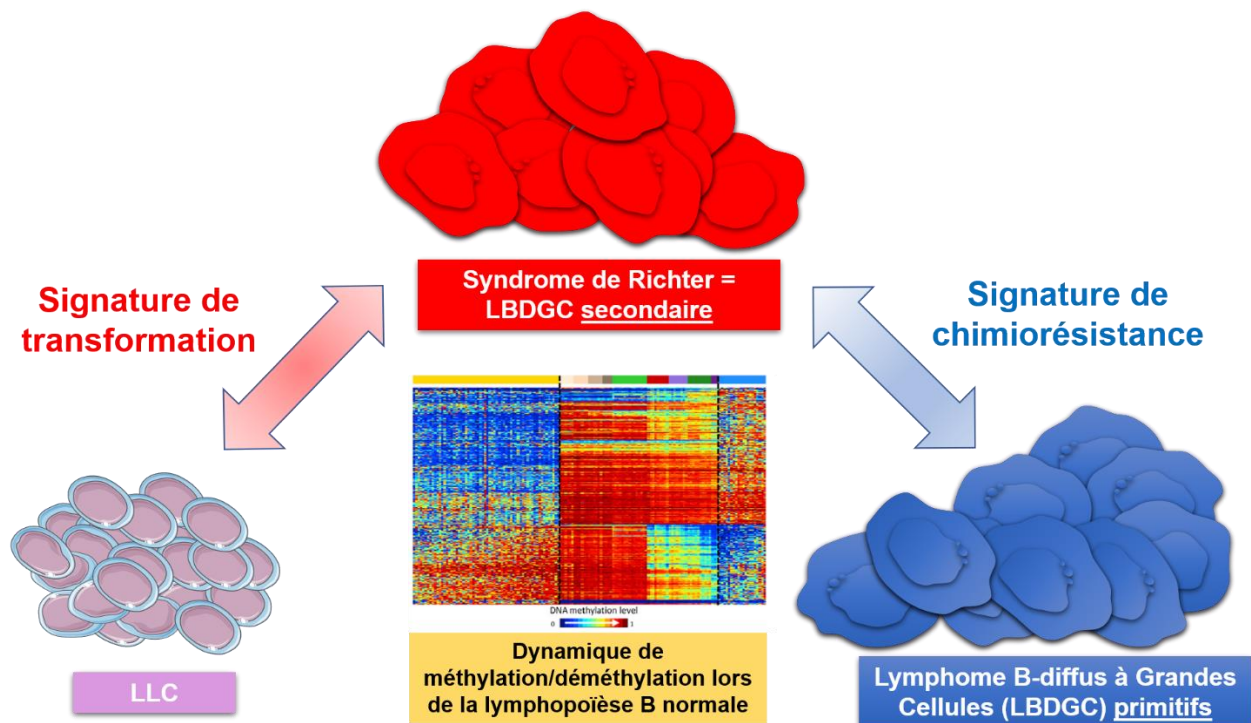


Figure 16. Présentation du volet d'étude du méthylome du Syndrome de Richter. Analyse comparative du Syndrome de Richter avec les pathologies les plus proches et la dynamique de méthylation de la lymphopoïèse B normale. D'après Queiros et al.

Synthèse

Objectifs

Identifier un profil de méthylation spécifique du Syndrome de Richter et comparaison de cette signature de méthylation avec la dynamique de méthylation/déméthylation observée au cours du développement lymphocytaire B normal pour identifier : (i) les éléments propres à la différenciation lymphocytaire B et (ii) les modifications en lien avec la lymphomagénèse.

Partenaires

Groupe FILO, CHRU de Nancy, Inserm U1256, Clinique Universitaire d'Ulm, Consortium ICGC (*International Cancer Genome Consortium*)

Financements

Région Lorraine 2017 : 25 000 euros (Julien BROSÉUS, Pierre FEUGIER, Rémi HOULGATTE), CHRU de Nancy (10 000 euros (Julien BROSÉUS, Pierre FEUGIER))

Etudiante SIR

Laurence SCHENONE (2018-2019)

État du projet

Méthylome réalisé à Nancy pour 96 échantillons. Collaborations avec l'Université d'Ulm en Allemagne et le Consortium ICGC (*International Cancer Genome Consortium*), permettant d'avoir plus de 300 échantillons témoins. Étude de corrélation méthylome-transcriptome chez les mêmes patients. Article en cours d'écriture.

5.3.2. Étude transcriptomique du Syndrome de Richter

En 2000, une étude transcriptomique des LBDGC primitifs a identifié deux sous-types de pronostic différent : le sous-type « *Germinal Center B Cell like* » et le sous-type « *Activated B Cell like* ». ⁽¹⁵⁸⁾ Ces sous-types présentent des anomalies spécifiques et des anomalies communes aujourd'hui très bien caractérisées sur le plan moléculaire. A contrario, les caractéristiques moléculaires du SR sont peu connues et les données établies ne permettent pas une caractérisation physiopathologique précise ni une prise en charge thérapeutique ciblée et efficace comme c'est le cas dans les LBDGC primitifs. ^(46, 159, 160)

Aucune étude transcriptomique du SR n'a été réalisée à ce jour. Le potentiel d'une telle étude est pourtant réel. Une étude par séquençage de l'ARN a permis de caractériser le panorama transcriptionnel de la LLC à la fois sur le plan du niveau d'expression des gènes, mais aussi du point de vue de l'épissage alternatif et des différentes isoformes transcriptionnelles qu'il génère. Ainsi le séquençage de l'ARN a pu identifier : (i) des profils d'expression géniques spécifiques de deux sous-types de LLC, (ii) des modifications de la répartition des différents transcrits alternatifs physiologiques de plusieurs gènes, dont *BCL2* et *SF3B1*, (iii) l'existence de transcrits nouveaux, spécifiques des cellules tumorales et (iv) la dérégulation de différentes voies d'activation cellulaires comme la voie du BCR et la voie JAK-STAT, associée à une prolifération tumorale accrue. ⁽¹²²⁾ Cette étude n'évoque pas la transformation de la LLC en SR.

Nous souhaitons réaliser une étude comparative par séquençage de l'ARN entre (i) les LBDGC *de novo* / primitifs, dont les caractéristiques transcriptomiques sont bien décrites, aussi bien au diagnostic ⁽¹⁵⁸⁾ qu'à la rechute ⁽⁴⁵⁾ et (ii) le syndrome de Richter.

Les objectifs sont d'identifier : (i) les gènes dont le niveau d'expression est différentiel (ii) les différences de répartition des différents transcrits alternatifs physiologiques, (iii) l'existence de transcrits spécifiques des différentes conditions comparées et in fine (iv) les perturbations de fonctions cellulaires à l'origine de l'agressivité et la chimiorésistance particulières du SR.

Notre première hypothèse est que le SR présente des anomalies transcriptionnelles à l'origine de dérégulations cellulaires spécifiques, expliquant son caractère particulièrement agressif (**Figure 17**). La caractérisation de ces anomalies permettrait la conception de thérapeutiques ciblées efficaces dans le SR.

Dr Julien BROSEUS

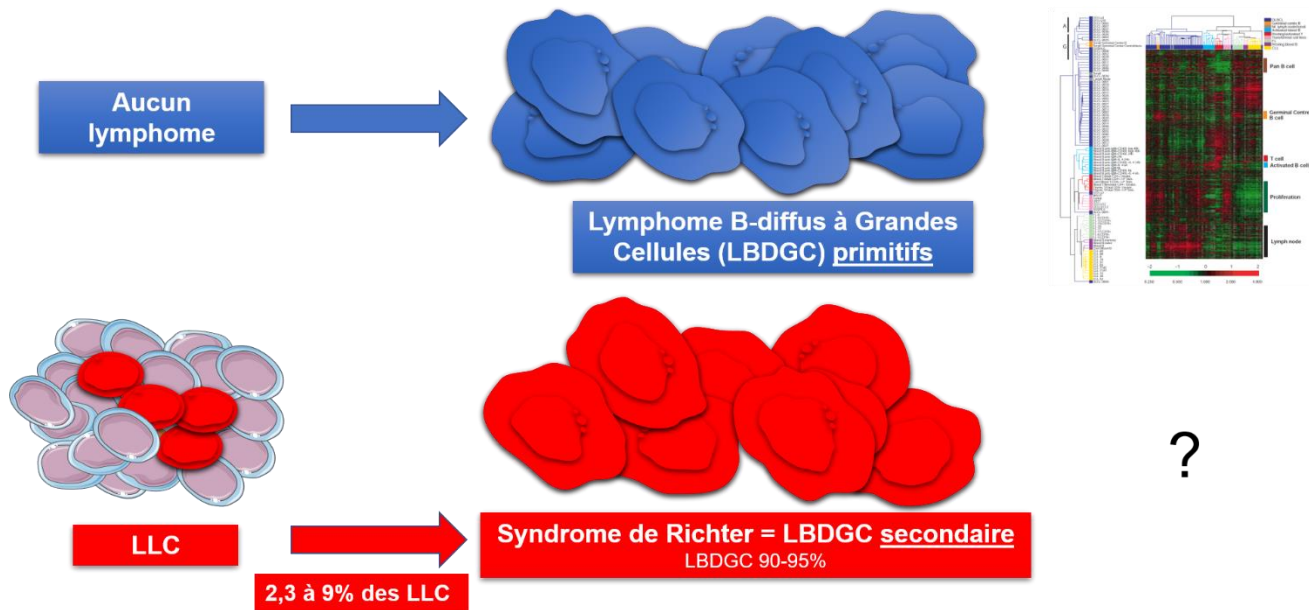


Figure 17. Présentation du volet d'étude transcriptomique du Syndrome de Richter. Analyse transcriptomique comparative des LBDGC primitifs et du Syndrome de Richter.

L'objectif est d'identifier une ou des signatures transcriptomique(s) spécifique(s) du syndrome de Richter, comparativement aux Lymphomes B-Diffus à Grandes Cellules primitifs (LBDGC, qui constituent l'entité de référence dans le domaine des lymphomes agressifs). D'après Alizadeh et al.

Synthèse

Objectifs	Identifier une signature transcriptomique spécifique du Syndrome de Richter, comparativement au lymphome agressif de référence (LBDGC) et au tissu ganglionnaire non-tumoral.
Partenaires	Groupe FILO, Inserm U1256, Université d'Ulm (Allemagne), IGBMC (Strasbourg)
Financements	Ligue contre le Cancer 2016 : 20 000 euros (Julien Broséus, Pierre Feugier) Cancéropôle Est 2017 : 20 000 euros (Julien Broséus)
Etudiante M2	Hélène AUGÉ (2019-2020)
État du projet	87 échantillons d'ARN de bonne qualité (<i>RNA Integrity Number</i> = 8-10) réunis en séquencés dont : 47 Richter + 2 LLC appariées, 28 LBDGC et 10 ganglions non-tumoraux. Résultats analysés. Validation des candidats les plus intéressants par une deuxième technique.

Dr Julien BROSEUS

5.3.3. Étude protéomique du Syndrome de Richter

Le protéome correspond à l'identification et la quantification de l'ensemble des protéines cellulaires à un instant « t ». La composition du protéome est hautement dépendante des processus de régulation à l'œuvre après la synthèse de l'ARN messager : la régulation post-transcriptionnelle, la traduction et la régulation de la dégradation des protéines. Les protéines étant les acteurs primaires de la physiologie cellulaire, l'étude du protéome permet la meilleure approche du fonctionnement cellulaire, dans des conditions physiologiques, mais aussi pathologiques. Les techniques nouvelles, en particulier l'imagerie cellulaire haut débit et la spectrométrie de masse permettent aujourd'hui une évaluation rapide et sensible du protéome cellulaire. La spectrométrie de masse offre la possibilité d'une quantification absolue des 5000 à 10000 protéines les plus abondantes (exprimées en nombre de copies par cellule), ceci à un coût raisonnable. La spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence l'expression d'environ 5000 protéines dont l'abondance était différentielle entre les différents organes.⁽¹⁶¹⁾ La quantification absolue du nombre de copies protéiques par cellule était possible dans une fourchette allant de 100 copies à 10 millions de copies, permettant une classification hiérarchique des différentes protéines selon leur niveau d'expression et la mise en évidence de profils spécifiques, ainsi que des profils de résistance à la chimiothérapie (**Figure 18**)⁽¹⁶²⁾. Ainsi, le transcriptome ne permet qu'une approche partielle du protéome et on estime que seulement 40% de la variation de la concentration d'une protéine peut être expliquée par la concentration de son transcrite.⁽¹⁶³⁾

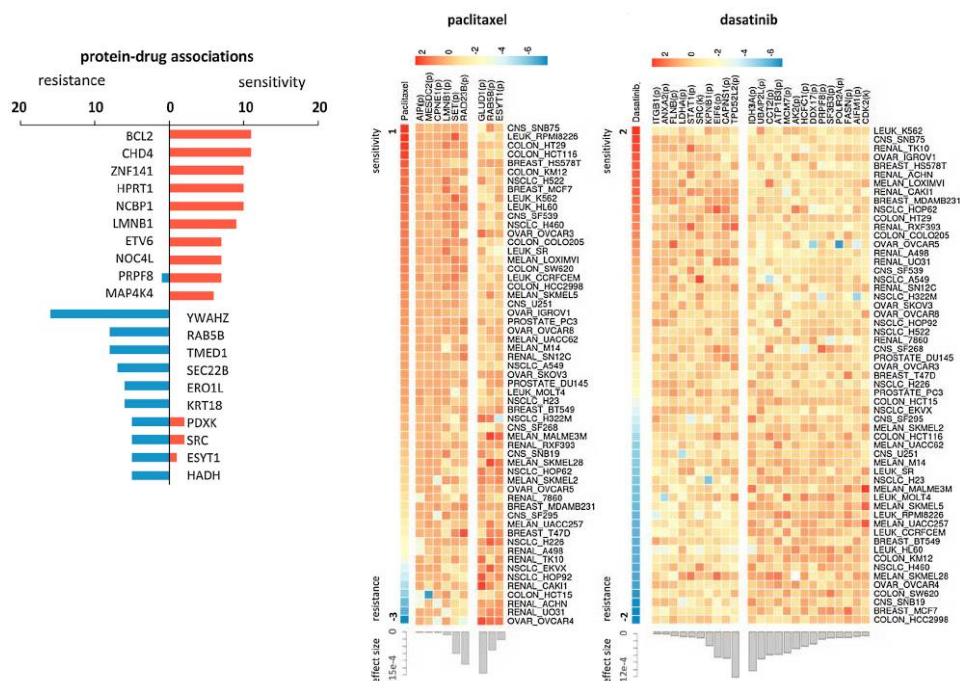


Figure 18. Mise en évidence de protéines associées de manière significative et récurrente à la résistance thérapeutique. D'après Gholami et al.

Notre équipe dispose d'une expérience dans le domaine de la protéomique appliquée à la LLC.⁽¹⁶⁴⁾ En revanche, aucune étude protéomique du syndrome de Richter n'a été réalisée à ce jour. Pourtant, les protéines sont les effecteurs réels du métabolisme cellulaire et constituent des cibles thérapeutiques de choix.

Dr Julien BROSEUS

caractériser pour chaque échantillon de chaque patient de chaque groupe. La qualité de l'extrait protéique a été vérifiée avant passage à l'étape de caractérisation des peptides.

La caractérisation du protéome de chaque échantillon a été réalisée par chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) sur la plateforme de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO) de l'Institut Hubert CURIEN à Strasbourg, partenaire du FILO. L'identification des protéines à partir des spectres de masse utilise les bases de données de type *Swiss-Prot*.

Les nouvelles technologies protéomiques permettent une quantification fine des différentes protéines présentes dans un échantillon, ainsi que des comparaisons robustes entre les groupes. Une approche de prédiction du protéome à partir des données du *RNA sequencing* pour les mêmes échantillons et de comparaison au protéome réel pourra également permettre l'identification de variants individuels, qui peuvent être responsables de défauts fonctionnels des protéines et impliqués dans les pathologies.

Analyse des données : l'analyse des données est menée conjointement par la plateforme LSMBO et l'équipe de recherche de l'unité Inserm U1256, par des chercheurs et des bio-informaticiens expérimentés pour ce type d'analyse. Une première analyse a permis d'identifier une liste de protéines différentielles très prometteuse. Nous menons actuellement une réanalyse des résultats à l'aide de plusieurs méthodes bioinformatiques publiées, pour extraire une liste robuste de protéines retrouvées avec toutes les méthodes testées.

Une étape de validation des protéines candidates par immunohistochimie sera ensuite planifiée.

Résultats attendus et perspectives :

Le syndrome de Richter constitue une évolution très péjorative de la LLC. Le pronostic est sombre, en raison d'une forte agressivité, conjuguée à une chimiorésistance aux thérapies classiquement efficaces dans les lymphomes B-diffus primitifs. Cette approche protéomique, originale, devrait nous permettre de sélectionner des protéines candidates, non exprimées dans les LBDGC primitifs chimiosensibles, ou dont l'expression est plus forte dans le syndrome de Richter comparativement aux LBDGC primitifs chimiosensibles et qui seraient autant de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Dr Julien BROSEUS

Synthèse

Objectifs	<p>Décrire les mécanismes de résistance tumorale du syndrome de Richter par l'identification des voies cellulaires dérégulées, ceci par une analyse combinée de l'exome, du transcriptome, du méthylome et du protéome comprenant une analyse comparative avec les autres types de LBDGC.</p> <p>Mettre en évidence un profil protéomique spécifique pour mieux comprendre les mécanismes de résistance tumorale et identifier des cibles thérapeutiques potentielles dans le syndrome de Richter.</p> <p>Réaliser une analyse intégrative transcriptome/protéome pour mieux comprendre la physiopathologie du syndrome de Richter et la régulation du niveau d'expression des protéines.</p>
Partenaires	Groupe FILO, CHRU de Nancy, Inserm U1256, Plateforme LSMBO Institut Pluridisciplinaire Hubert CURTIEN, Strasbourg
Financements	Ligue contre le Cancer 2018 : 24 000 euros (Julien BROSEUS, Pierre FEUGIER).
Etudiants M2	Romain MORIZOT (2018-2019), Romain PIUCCO (2019-2020)
État du projet	Protéome réalisé pour 59 échantillons par spectrométrie de masse en mars 2019. Analyses et écriture de l'article en cours. Une partie de ces travaux a été proposée sous la forme d'un abstract au congrès annuel 2020 de la Société Américaine d'Hématologie.

Dr Julien BROSEUS

Abstract soumis pour le congrès 2020 de l'Association Américaine d'Hématologie.**Large-Scale Proteomics Identifies Distinct Signatures for Richter Syndrome and De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A French Study from the Filo Group.**

Romain Morizot, Sebastien Hergalant*, Romain Piucco, Florian Bouclet, Anne Quinquenel, MD, Caroline Dartigeas*, Hélène Augé, Eugen Tausch, Sandra Lomazzi, Hélène Busby, Cécile Tomowiak, Veronique Leblond, Catherine Thieblemont, Florence Cymbalista, Marie Christine Béné, Stephan Stilgenbauer, Romain Guieze, Christine Carapito, Aurore Perrot, Luc Mathieu Fornecker, Pierre Feugier and Julien Broséus.*

Richter syndrome (RS) occurs during the disease course of 2 to 10% of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) subtype accounts for 90-95% of RS cases. While presenting with the same morphology as de novo DLBCLs, DLBCL subtype of RS is associated with a very poor outcome.

Proteins are the primary cellular biological effectors. Proteome composition is highly dependent on regulatory mechanisms located both upstream and downstream translation (transcriptional regulation, post-translational modifications, protein metabolism). Thus, the analysis of the genome and the transcriptome only allows a putative extrapolation of the expressed proteome. Proteomic studies have been performed in the context of de novo DLBCLs (Fornecker et al. Sci Rep. 2019), unravelling a set of proteins associated with refractoriness. In CLL, it showed different profiles according to IGHV mutational status after B-Cell Receptor activation (Perrot et al. Blood 2011). No proteomic study of RS has been carried out to date.

RS sample selection was performed across 7 French institutions affiliated to the FILO (French Innovative Leukemia Organization). A total of 49 fresh frozen biopsies were collected, including 28 de novo DLBCLs and 21 RS, mostly treated with first line R-CHOP. All biopsies were centrally reviewed. RS samples were characterized, with data on CLL-RS clonal relationship and mutational status for a 13-gene panel representing the most frequently mutated genes in CLL. Only DLBCL subtype RS samples with at least 50% tumor purity (range 50-95%) and a minimum 10 mg weight were selected. Peptide measurements were performed using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, according to published methods (Muller et al. Sci Rep. 2018). Stringent quality controls were applied to ensure sample integrity, abundance accuracy and overall reproducibility. Proteome reconstruction at peptide and at protein level was achieved with a specifically devised pipeline involving conditional filtering, full normalization, categorization and imputation of missing values. These tools made use of the R/Bioconductor DEP package (Zhang et al. Nat Protoc. 2018). Supervised (Bayesian linear models) and unsupervised (hierarchical clustering, K-means, PCA) analyses were further applied to identify differential protein signatures. These were functionally annotated with ReactomePA (Yu et al. Mol Biosyst. 2016) for pathways and STRING (Szklarczyk et al. Nucleic Acids Res. 2019) for association networks.

Extended proteomics analysis identified 1,772 proteins, among which 191 were differentially expressed (False Discovery Rate/FDR < 0.05) in RS samples compared to de novo DLBCLs, with 82 increased and 109 decreased proteins. Hierarchical clustering revealed a highly correlated expression profile of these top candidates and clearly separated the 21 RS and the 28 *de novo* DLBCL samples. Sample distribution was independent from chemosensitivity/resistance, for DLBCL samples, and also unrelated to GCB/Non-GCB phenotype according to Hans algorithm, Epstein-Barr virus positivity or tumor purity. Functional interactome is an in silico protein-protein interaction network built on published data from the literature and available in public databases. The functional interactome computed from the 82 proteins overexpressed in RS showed a strongly enriched association network (protein-protein interactions; p-value < 1e-16), with an over-representation in BCR pathway, VEGF signaling, JAK-STAT pathway and Interleukin-12, Rho GTPase, and actin coiling (FDR < 0.05). Proteins underexpressed in RS (109) also displayed highly associated interactions (p-value < 1e-16) with

Dr Julien BROSEUS

a main node including proteins involved in cell death regulation, extracellular matrix organization, regulation of Insulin Growth Factor, and signaling by receptor tyrosine kinase (FDR < 0.05).

Here we performed proteomics on a 49-sample cohort of 28 *de novo* DLBCLs and 21 RS, which revealed a specific and differential signature in RS. This includes increased expression of targets within the druggable signaling pathways BCR and JAK-STAT. Furthermore the decrease in proteins involved in cell death regulation and extracellular matrix organization suggests resistance mechanisms to apoptosis and immune system in RS.

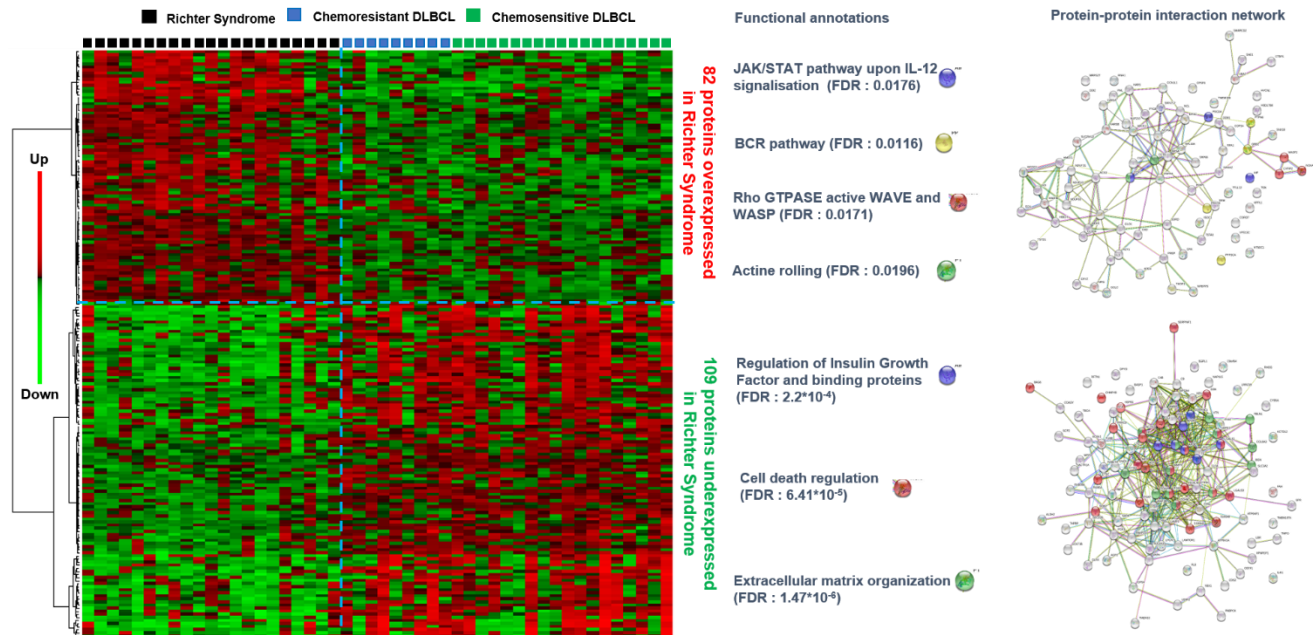


Figure 20. Classification hierarchique des 191 protéines dont l'expression est significativement différentielle (*False Discovery Rate* < 0.05) entre le Syndrome de Richter (n=21) et les LBDGC primitifs (n=28) avec leurs principales annotations fonctionnelles et le réseau d'interaction protéine-protéine reconstitué *in silico* à partir des données publiques disponibles.

Dr Julien BROSEUS

5.3.4. Étude des facteurs pronostiques moléculaires dans le Syndrome de Richter

Objectifs Décrire la cohorte multicentrique du groupe FILO et identifier de nouveaux marqueurs pronostiques, notamment moléculaires, au diagnostic de Syndrome de Richter

Partenaires Inserm U1256, Groupe FILO, Université d'Ulm (Allemagne), Centre d'Investigations Cliniques-EC 1433 (CHRU de Nancy)

Etudiante M2 Charline MOULIN (2019-2020)

État du projet Cohorte de 103 patients recrutés dans 10 centres français affiliés au groupe FILO. Pour 58 de ces patients, nous disposons d'une biopsie congelée au diagnostic de syndrome de Richter, autorisant une étude moléculaire par séquençage haut débit ciblé. Ce travail a été proposé sous la forme d'un abstract au congrès annuel 2020 de la Société Américaine d'Hématologie et sera soumis fin août sous la forme d'un article original.

Abstract soumis pour le congrès 2020 de l'Association Américaine d'Hématologie.

Clinico-Biological, Molecular and Prognostic Features of Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma-Variant of Richter Syndrome: A Multicenter Retrospective Study of the French Innovative Leukemia Organization

Charline Moulin, Francis Guillemain, Thomas Remen, Florian Bouclet, Hélène Augé, Anne Quinquenel, Caroline Dartigeas, Romain Morizot, Sandra Lomazzi, Hélène Busby, Sebastien Hergalant, Eugen Tausch, Cécile Tomowiak, Veronique Leblond, Catherine Thieblemont, Florence Cymbalista, Kamel Laribi, Marie C Bene, Stephan Stilgenbauer, Romain Guieze, Pierre Feugier and Julien Broséus**

**Equal contribution.*

Richter Syndrome (RS) corresponds to the transformation of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) or Small Lymphocytic Lymphoma (SLL) into an aggressive lymphoma, in most cases a Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL). RS outcome is variable and still poorly understood. The aim of our study was to analyze the clinical, biological and molecular features liable to predict survival in a retrospective series of newly diagnosed RS from the French Innovative Leukemia Organization (FILO).

From 10 French centers, 103 biopsy-confirmed DLBCL subtype RS, diagnosed from 2001 to 2019 were identified. Fresh-frozen biopsies (FB) were available in 58 cases. All biopsies were centrally reviewed. Clinical and biological characteristics at CLL and RS diagnoses including cytogenetics, clonal relationship with the pre-existing CLL, Epstein-Barr virus (EBV) status, cell of origin (COO) according to the Hans algorithm, RS prognostic scores (Tsimberidou et al. J Clin Oncol. 2006, Rossi et al. Blood 2011) as well as treatment and outcomes were collected. Targeted next generation sequencing was used on RS FB for the following gene set: *TP53, ATM, SF3B1, NOTCH1, BIRC3, FBXW7, RPS15, EGR2, MYD88, XPO1, POT1, BRAF, and NFKBIE*. Overall Survival (OS) was defined as time from RS diagnosis until the date of death or end of follow-up and analyzed using Kaplan-Meier method. Multivariable analysis was performed using Cox regression model for variables with a p-value<0.2 by bivariate analysis. Statistical analysis was performed with SASv9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Clinical and biological characteristics and outcomes were broadly similar between the full 103-patient cohort and the subset of 58 patients with available gene mutation data. The latter only was considered for the subsequent analyses. The median age at CLL/SLL diagnosis was 60 (range 34-81) and 39 patients (67.2%) were

Dr Julien BROSEUS

male. Prior to RS, 24 (41.38%) received more than 1 line of treatment for CLL. The median time to transformation was 5 years (range 0-22). The median OS from RS diagnosis was 8 months. The median age at RS diagnosis was 65.5 years (range 42-87). ECOG Performance Status (PS) was >1 in 29/53 patients (54.8%) and 32/56 (57.1%) had a Bulky disease. Elevated Lactate DeHydrogenase (LDH) levels ($\geq 1.5N$) were found in 38/49 patients (77.6%). Unmutated *IGHV* was observed in 45/58 (77.6%) RS samples. CLL and RS were clonally related for 29/33 (87.9%) RS with available *IGHV* sequence at CLL diagnosis. TP53 disruption was detected in 34/56 (60.7%) RS cases including TP53 mutations in 23/58 (39.7%). According to Tsimberidou et al., 10/46 (21.7%) RS were in the low-risk group, 10 in the low-intermediate risk group, 11 (23.9%) in the high-intermediate risk group and the other 15 in the high-risk group. According to the Rossi score, only 4/51 RS (7.8%) were low risk, and 19 (37.3%) and 28 (54.9%) intermediate and high-risk, respectively. The most frequent treatment for RS was R-CHOP-like regimen [38/56 (67.9%)], 5 and 2 patients received autologous or allogeneic stem cell transplantation respectively. Most patients, 40/56 (71.4%) failed to reach complete remission after the first line. By bivariate analysis, ECOG PS, platelet count and TP53 disruption worsened OS ($p < 0.05$) while the effect of the *IGHV* status was less important ($p\text{-value} = 0.07$). By multivariable Cox regression model, ECOG PS >1, platelet count $< 100 \times 10^9/L$, TP53 disruption or unmutated *IGHV* status significantly reduced OS (hazard ratios 2.99, 2.22, 2.96 and 1.77, $p < 0.05$ for all). *NOTCH1* status had no significant impact. Similar results were obtained when a Cox regression model was realized with a backward and/or forward selection of variables respectively with stay $p\text{-value} = 0.05$ and/or an entry $p\text{-value} = 0.2$.

RS outcome is poor. Here, we focused specifically on Richter cells on diagnostic biopsies for genetic analyses. Unmutated *IGHV* status was identified as prognostic factor for RS, in addition to the previously described: ECOG PS, platelet count and TP53 disruption. More molecular studies are necessary to increase knowledge about RS and improve the survival of patients with DLBCL-type RS.

Features	HR	LCI	UCI	p-value
ECOG PS at RT >1	2.99	1.44	6.25	0.003*
Platelet count at RT $< 100 \times 10^9/L$	2.22	1.12	4.39	0.022*
Unmutated <i>IGHV</i> on Richter cells	2.87	1.14	7.19	0.025*
TP53 disruption on Richter cells	2.96	1.47	5.95	0.002*
Mutated <i>NOTCH1</i> on Richter cells	1.77	0.92	3.42	0.087

*Statistically significant at type I threshold $\alpha = 0.05$

Tableau 14. Paramètres associés à la survie globale dans le Syndrome de Richter, déterminés par analyse multivariée.

Dr Julien BROSEUS

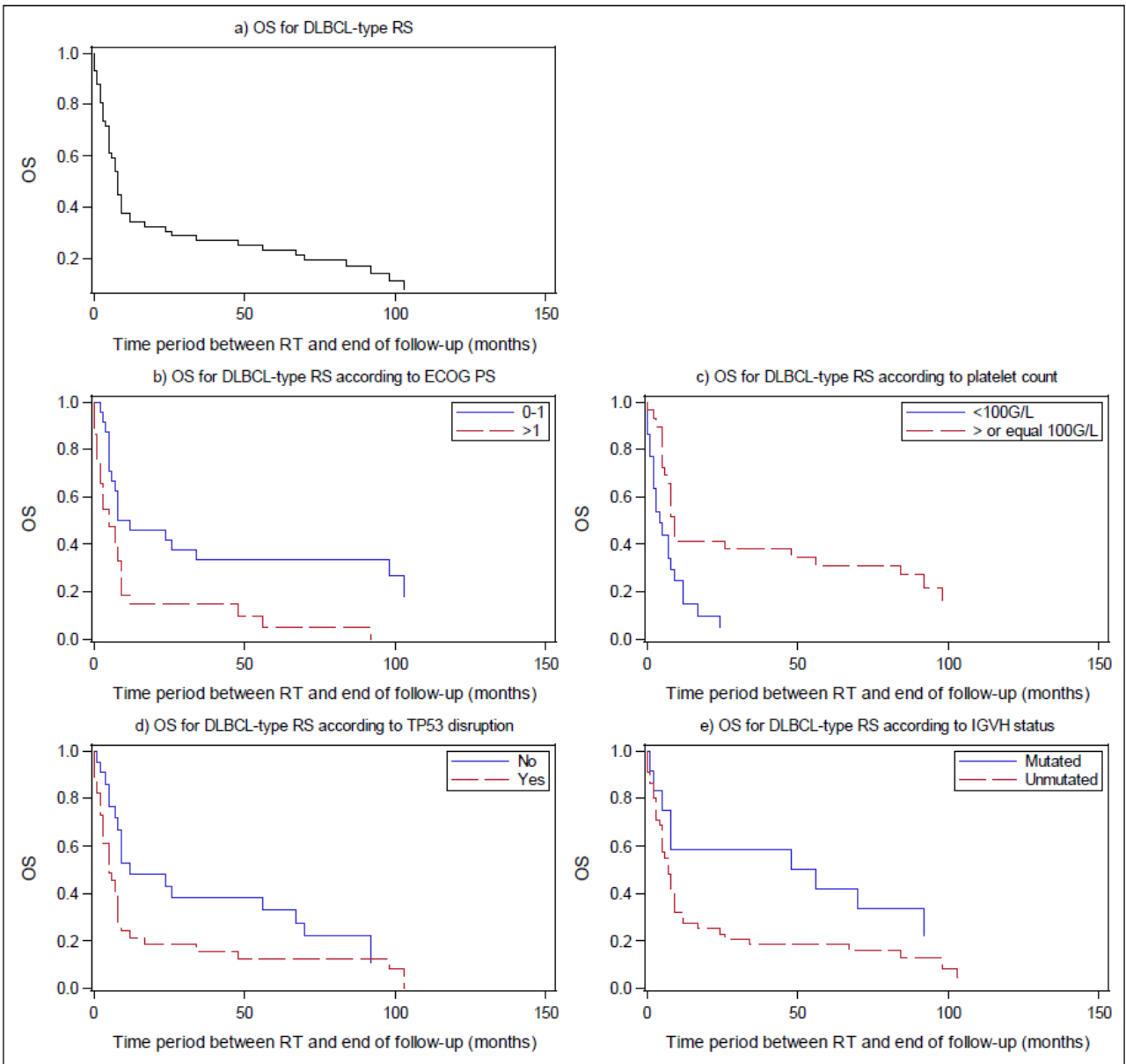


Figure 21. Survie globale (a) de la cohorte complète, survie globale en fonction (b) de l'ECOG PS, (c) de la numération plaquettaire, (d) de l'existence d'une anomalie de *TP53*, et (e) du status mutationnel *IgHV*. Ces paramètres sont évalués au diagnostic de Syndrome de Richter.

5.4. Projet à moyen et à long terme : Évaluation de l'intérêt de l'étude de l'ADN tumoral circulant pour le monitoring de la LLC et le diagnostic précoce de la transformation en syndrome de Richter

Le diagnostic des cancers ainsi que le suivi de leur évolution clonale requièrent de multiples biopsies tumorales, ce qui n'est pas applicable en pratique courante en raison de l'aspect invasif et douloureux de ces procédures. L'ADN tumoral circulant (ctDNA) provient des cellules tumorales détruites par apoptose et est relargué dans le compartiment sanguin d'où il peut être facilement prélevé à différentes étapes de la maladie. De plus, le ctDNA isolé à partir du sang circulant est issu de l'ensemble des différentes localisations tumorales de l'organisme. Il est donc beaucoup plus représentatif de la complexité tumorale que ne l'est une biopsie pratiquée sur un seul site anatomique envahi. L'utilisation du ctDNA pour approcher la biologie tumorale est appelée « biopsie liquide ».⁽¹⁶⁵⁾

L'étude de l'ADN tumoral circulant a été abondamment utilisée dans le contexte des lymphomes, de par le développement de méthodes de sélection permettant de focaliser l'analyse sur un panel de gènes pertinents, régulièrement décrits comme étant associés à la lymphomagénèse. Ces études ont montré (i) une corrélation d'au moins 85% entre les résultats de l'analyse de l'ADN issu de la tumeur native et ceux obtenus à partir du ctDNA, (ii) une excellente capacité à prédire la rechute avant la positivation du TEP-scanner (*Gold Standard* actuel), (iii) de même que l'identification de cibles thérapeutiques potentielles. Le ctDNA est donc une source de matériel tumoral constituant une alternative valable à la biopsie ganglionnaire dans les lymphomes.⁽¹⁶⁶⁻¹⁷⁰⁾

Il est intéressant de constater que la recherche de l'ADN tumoral circulant présente aussi un intérêt dans le contexte de syndromes lymphoprolifératifs présentant une forte quantité de cellules tumorales circulantes, en particulier la LLC. De plus, outre la recherche de la maladie résiduelle, l'étude du ctDNA pourrait s'avérer payante pour détecter l'évolution clonale du lymphocyte B malin, dont l'issue la plus grave est la transformation histologique en syndrome de Richter.⁽¹⁷¹⁾ L'analyse du ctDNA peut aussi tout à fait constituer un moyen répété et non-invasif d'explorer l'évolution tumorale et l'apparition de nouvelles mutations associées à la résistance tumorale dans le SR.

L'avènement du CAPP-Seq (*Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing*) permet de sélectionner un panel de gènes et de *hotspots* de mutations préalablement choisis.^(172, 173) Il est donc possible de concentrer le séquençage sur la détection de seules mutations ponctuelles, insertions/délétions et points de fusion spécifiques du type de lymphome étudié (soit un panel de gènes correspondant à quelques centaines de kilobases) pour obtenir une détection d'une grande sensibilité. Deux études récentes ont montré que l'étude du ctDNA constituait une alternative sérieuse à la biopsie ganglionnaire, à la fois pour la caractérisation génétique initiale de la tumeur, mais aussi pour la détection des différents sous-clones tumoraux pouvant se développer au cours de l'évolution de la maladie.^(174, 175)

L'ensemble de ces études ont démontré que l'étude du ctDNA constitue un moyen fiable, non-invasif et reproductible d'identifier la présence du génome tumoral et de surveiller son évolution, dans le contexte des lymphomes agressifs, mais aussi de la LLC. Ainsi l'étude du ctDNA pourrait être utilisée pour détecter et étudier la transformation en SR.

5.4.1. Etude BLINART (*BLINAtumomab after R-CHOP debulking therapy for patients with Richter Transformation*).

Le Syndrome de Richter (SR) est défini comme la transformation histologique de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC), une hémopathie lymphoïde B réputée peu évolutive, en un lymphoma B agressif prenant dans l'immense majorité des cas le visage d'un LBDGC, et plus rarement celui d'une maladie de Hodgkin. La prise en charge du SR est extrêmement difficile. En particulier, au contraire des LBDGC primitifs, l'immunochimiothérapie par R-CHOP n'est que très peu efficace sur le SR, avec un taux de réponse globale observée dans 41 à 67% des cas selon les essais prospectifs, et une survie globale d'environ 1 an (**Tableau 15**).

reference	regimen	n	CR (%)	ORR (%)	OS (median or n-year %)
Chemo-based regimens					
Clinical trials					
Eyre <i>BJH</i> 2016	O-CHOP + O-maintenance	37	27	46	11 months
Langerbeins <i>AJH</i> 2014	R-CHOP	15	7	67	21 months
Tsimberidou <i>Clin Lymph Myeloid Leuk</i> 2013	OFAR	35	8.6	42.9	7 months
Tsimberidou <i>JCO</i> 2008	OFAR	20	10	50	8 months
Tsimberidou <i>Cancer</i> 2003	R-hyper-CVXD-R-MA	30	38	41	10 months
Tsimberidou <i>Leuk Lymph</i> 2002	FACPGM	15	5	5	2.2 months
Dabaja <i>Leuk Lymph</i> 2001	Hyper-CVXD	29	38	41	10 months
Giles <i>Blood</i> 1996	PFA/CFA	12	18	45	17 months
Retrospective cohorts					
Rogers <i>BJH</i> 2018	R-EPOCH	46	20	37	6 months
Durot E, <i>EJH</i> 2015	DHAP/ESHAP	28	25	43	8 months
Tsimberidou <i>JCO</i> 2006	chemo	79	na	34	1-y OS : 37%
	CIT	47	na	47	
Targeted therapies					
Kuruville <i>Blood</i> 2017	selinexor	7	0	40	na
Ding <i>Blood</i> 2017	pembrolizumab	9	11	44	11 months
Davids <i>JCO</i> 2017	venetoclax	7	0	43	na
Transplantation					
Cwynarski <i>JCO</i> 2012	auto-SCT	34	na	na	3-y OS : 59%
	allo-SCT	25	na	na	3-y OS : 36%

Tableau 15. Stratégies thérapeutiques évaluée dans le cadre du Syndrome de Richter.

En revanche, la prise en charge de la LLC a été récemment bouleversée par l'arrivée des nouvelles thérapies ciblées comme les inhibiteurs du BCR^(114, 176) ou les inhibiteurs de BCL2.⁽¹¹⁷⁾ Ces drogues ne préservent cependant pas de la transformation de la LLC en SR, qui représente encore aujourd'hui 30 à 50% des cas de progression de la maladie. L'évolution de la LLC en SR devient donc le principal obstacle à un contrôle de la maladie sur le long terme et une question médicale cruciale non résolue.^(177, 178)

Le Blinatumomab (*BLINCYTO*) est un anticorps bispécifique de type *bi-specific T-cell engaging* (BiTE®) qui relie de manière transitoire les lymphocytes T CD3+ aux lymphocytes B CD19+, ce qui induit l'activation des lymphocytes T au contact des lymphocytes malins et la lyse de ces cellules malignes.⁽¹⁷⁹⁾

Des études pionnières ont montré l'efficacité de ce traitement dans le contexte des Leucémies Aiguës Lymphoblastiques de phénotype B (LAL B), menant à son approbation par la *Food and Drug Agency* (FDA) pour le traitement des LAL B réfractaires ou en rechute.⁽¹⁸⁰⁻¹⁸³⁾

Plus récemment, le Blinatumomab a été évalué dans le contexte des LBDGC réfractaires ou en rechute. Une étude de phase 2 a utilisé des doses croissantes (9 puis 28 puis 112 µg/J) de blinatumomab en intra-veineuse continue et a montré des résultats encourageants avec un taux de réponse de 43% et une rémission complète dans 19% des cas après 1 cycle de traitement.⁽¹⁸⁴⁾ Des données récentes ont permis de démontrer la présence d'infiltrats lymphocytaires T au sein d'échantillons biopsiques de SR. La présence de ces infiltrats était corrélée au taux de réponse clinique au pembroluzimab, un anticorps bloquant anti-PD-1, alors qu'aucune activité de ce type n'a été observée dans la LLC.^(185, 186)

Dr Julien BROSEUS

L'objectif de l'étude BLINART est d'évaluer l'efficacité, la sécurité et la tolérance du blinatumomab, administré après 2 cures de réduction de la masse tumorale par R-CHOP, chez les patients présentant un SR d'histologie type LBDGC (**Figure 22**).

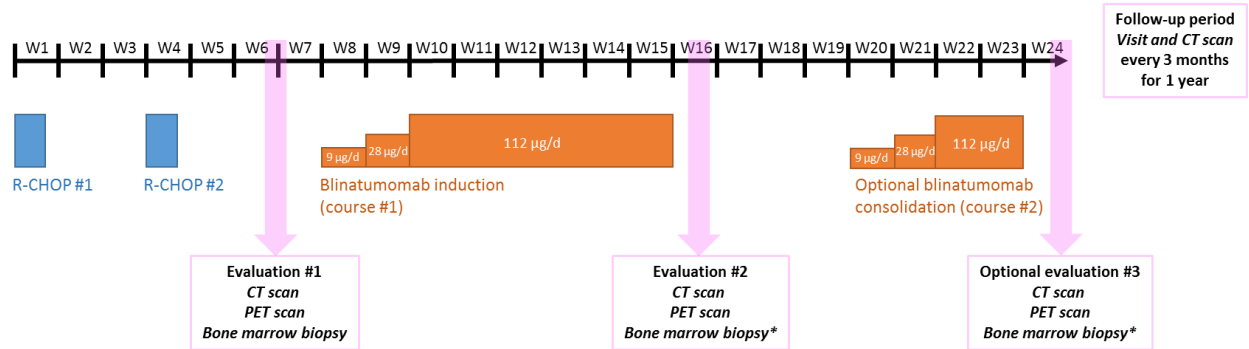


Figure 22. Construction de l'étude BLINART

Dr Julien BROSEUS

5.4.2. Première étude ancillaire à l'étude BLINART : monitoring de l'ADN tumoral circulant.

Objectifs	Montrer que l'étude de l'ADN tumoral circulant est une méthode fiable pour réaliser le diagnostic de transformation d'une LLC en SR. Montrer que l'étude de l'ADN tumoral circulant est une méthode fiable pour réaliser le suivi d'un SR sous traitement.
Partenaires	Groupe FILO Groupe du Pr Stephan STILGENBAUER (Clinique universitaire d'Ulm, Allemagne). Dr Alexandre HARLÉ, Pr Jean-Louis MERLIN (Institut de Cancérologie de Lorraine).
Financements	FORCE HEMATO 2018 : 10 000 euros (Dr BROSEUS, Pr GUIEZE, Pr FEUGIER)
État du projet	Inclusions débutées depuis juin 2019.

5.4.3. Deuxième étude ancillaire à l'étude BLINART Étude de l'évolution tumorale de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en syndrome de Richter (SR).

Constitue la continuité du projet « Étude de l'évolution tumorale de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en syndrome de Richter (SR) » détaillée au point 5.2.3.

Objectifs	Etudier l'évolution tumorale entre le stade LLC et le stade Richter Identifier au stade de LLC, des anomalies génomiques prédictives de la transformation en SR
Partenaires	Groupe FILO (<i>French Innovative Leukemia Organization</i>) Groupe du Pr Catherine WU (Boston) et du Pr Romain GUIEZE (Boston, Clermont) Groupe du Pr Stephan STILGENBAUER (Ulm)
Financements	Force HEMATO 2018 : 40 000 euros (Pr GUIEZE, Pr FEUGIER, Dr BROSEUS)
État du projet	Inclusions débutées depuis juin 2019.

Dr Julien BROSEUS

5.5. Projet à moyen et à long terme : Génomique intégrative des syndromes myélodysplasiques purs et mixtes myéloprolifératifs / myélodysplasiques.

Le projet d'étude multi-omique des syndromes mixtes myélodysplasiques/myéloprolifératifs et des syndromes myélodysplasiques purs remonte à mon internat de Biologie Médicale, au cours duquel j'ai développé cette thématique sous le patronage du Professeur François GIRODON à Dijon.

Nous avons étudié en particulier une entité rare appelée ARS-T (Anémie réfractaire avec Sidéroblastes en couronne et Thrombocytose), qui conjugue des caractéristiques dysplasiques de la moelle (anémie avec sidéroblastes en couronne) et des caractéristiques myéloprolifératives (thrombocytose). En réunissant un grand nombre de cas à l'échelle européenne, nous avons pu mieux caractériser cette entité rare du point de vue clinique, biologique et moléculaire.

Souhaitant continuer cette collaboration fructueuse et maintenir le réseau international créé à l'époque (réseau européen COST, laboratoire MLL à Munich), nous avons choisi de travailler sur les déterminants de la myéloprolifération dans les ARS-T triple-négatives (**Figure 23** ; exposé détaillé ci-dessous).

Ce travail constitue l'un des deux volets de la Thèse d'Université de Marion DIVOUX (Autorisation de Co-encadrement de Thèse : Dr Julien BROSEUS).

Le développement concomitant d'une thématique de recherche sur les modifications du méthylome des syndromes myélodysplasiques purs traités par agents déméthylants (projet MYRAGE, porté par le Dr BROSEUS) permet d'enrichir le contenu de la Thèse de Marion DIVOUX et de se projeter vers de nouvelles collaborations locales sur la génomique des syndromes myélodysplasiques, en lien avec l'équipe du Professeur Marie-Thérèse RUBIO et du Docteur Maud D'AVENI à l'UMR 7365 IMoPa (UMS 2008 IBSLor).

Il s'agit du deuxième pilier du projet scientifique présenté pour les 10 ans à venir.

5.5.1. Étude génomique des ARS-T triples-négatives (*JAK2*, *MPL*, et *CALR* non-mutées).

L'Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes en couronne et Thrombocytose (ARS-T) est une forme de néoplasie mixte myéloproliférative/myélodysplasique (SMP/SMD) qui présente à la fois les caractéristiques myéloprolifératives de la Thrombocytémie Essentielle (TE) et les caractéristiques myélodysplasiques de l'Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes en couronne (ARS). L'ARS-T a été définie pour la première fois en 2001 et reprise dans la version 2008 de la classification OMS (Organisation mondiale de la Santé) des pathologies hématologiques, en tant qu'entité provisoire associant anémie, dysplasie érythroblastique et sidéroblastes en couronne, avec thrombocytose et prolifération de grands mégakaryocytes atypiques.⁽²⁹⁾

Les premières études ont montré que l'ARS-T est associée à un taux élevé de mutations de *Janus kinase 2* (*JAK2*),^(8-12, 16) et dans une moindre mesure, des mutations du gène *MPL*, codant pour le récepteur de la thrombopoïétine (TPO).⁽¹²⁾ Plusieurs cas d'évolution d'ARS en ARS-T par l'acquisition de la mutation *JAK2*^{V617F} ont été décrits, renforçant l'hypothèse de l'ARS-T en tant que maladie indépendante.⁽¹⁸⁷⁾ Une vaste étude rétrospective européenne regroupant 200 cas d'ARS-T a montré que celui-ci se distingue de l'ARS et de la TE, du point de vue clinique, biologique et pronostique.⁽³¹⁾

Les mutations affectant les gènes codant pour les composants de l'épissage, telles que *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF35* et *ZRSR2*, sont associées aux syndromes myélodysplasiques,^(32, 33) et les mutations de *SF3B1* sont particulièrement fréquentes dans les SMD présentant un grand nombre de sidéroblastes en couronne.^(33, 35) Dans

Dr Julien BROSEUS

l'ARS-T, les mutations de *SF3B1* sont retrouvées dans une proportion élevée de cas, fréquemment associées à la mutation *JAK2*^{V617F} (35-37, 39, 54) ce qui démontre de manière définitive que l'ARS-T est une entité distincte, caractérisée par un spectre de mutations, associant des mutations responsables de la partie myélodysplasique et des mutations responsables du caractère myéloprolifératif, à savoir l'excès de plaquettes.

L'ARS-T est maintenant établie en tant qu'entité indépendante dans la nouvelle révision de la classification de l'OMS et est appelée néoplasie myéloproliférative/myélodysplasique avec thrombocytose et sidéroblastes en couronne (SMP/SMD-T-SC).⁽³⁾ Cette classification définit un les SMP/SMD-R-T selon les critères diagnostiques suivants : (i) anémie associée à une dysplasie érythroblastique ou multilignée, $\geq 15\%$ de sidéroblastes en couronne (nécessaire même en présence d'une mutation de *SF3B1*), $< 1\%$ de blastes circulants et $< 5\%$ de blastes médullaires ; (ii) thrombocytose persistante avec une numération plaquettaire > 450 G/L ; (iii) présence d'une mutation de *SF3B1*, ou à défaut, absence de traitement cytotoxique ou par facteur de croissance pouvant expliquer les caractéristiques myélodysplasiques et myéloprolifératives ; (iii) absence de gène de fusion *BCR-ABL1*, de réarrangement de *PDGFRA*, *PDGFRB* ou *FGFR1*, de réarrangement *PCMI-JAK2*, de translocation (3;3)(q21;q26), d'inversion (3)(q21q26) ou de délétion 5q et (iv) pas d'antécédent de SMP, de SMD (excepté en cas de présence de sidéroblastes en couronne), ou d'un autre type de SMP/SMD.

Le paysage mutationnel des SMP (hors Leucémie Myéloïde Chronique) est dominé par : (i) la mutation gain de fonction *JAK2*^{V617F} située dans l'exon 14 du gène *JAK2*,^(4, 188) les mutations faux-sens situées dans l'exon 10 du gène *MPL* (17, 189) et des insertions/délétions entraînant un décalage du cadre de lecture situées dans l'exon 9 du gène *CALR* (Calréticuline), conduisant à l'activation autocrine de MPL, le récepteur à la TPO.^(20, 21) Mais d'autres mutations ont été identifiées. La voie de signalisation JAK-STAT peut également devenir activée de manière constitutive par (i) des mutations de perte de fonction affectant des régulateurs négatifs telles que les voies de signalisation LNK (protéine adaptatrice spécifique des lymphocytes),^(190, 191) *CBL* (proto-oncogène du lymphome de la lignée Casitas B),⁽¹⁹²⁾ et *SOCS3* (Suppresseur de la signalisation des cytokines 3)⁽¹⁹³⁾ ou (ii) des mutations de gain de fonction affectant la voie RAS telles que des mutations de *NRAS*,⁽¹⁹⁴⁾ *NF1*,⁽¹⁹⁵⁾ et *PTPN11*.⁽¹⁹⁶⁾ Des mutations affectant les régulateurs épigénétiques, bien que non spécifiques des SMP, ont également été décrites, telles que les mutations perte de fonction du gène *TET2*,^(59, 197) les mutations de *ASXL1*,⁽¹⁹⁰⁾ les mutations perte de fonction de *DNMT3a*,^(195, 198) les mutations de perte de fonction de *EZH2*⁽¹⁹⁹⁾ et les mutations affectant *IDH1* et *IDH2*.⁽¹⁹⁵⁾

Dans les SMP/SMD-T-SC, les caractéristiques myélodysplasiques peuvent être expliquées par des mutations du composant spliceosome telles que *SF3B1* (85-90%), *SRSF2* (7%), *U2AF35* (4%) et *ZRSR2* (3%) et / ou mutations affectant les régulateurs épigénétiques tels que *ASXL1* (15-29%), *TET2* (10-25%), *EZH2* (7%), *DNMT3A* (13-15%), *SETBP1* (13%) et *IDH2* (0-4%).^(31, 36, 37, 41, 54, 55) Contrairement aux MPN, des mutations affectant la voie de signalisation JAK-STAT, telles que les mutations *JAK2*^{V617F}, *MPL*, *CBL* et *CALR*, sont respectivement présentes dans 42-57%, 1-3%, 4% et 0-1% des cas.^(31, 37, 41, 54, 55) et des mutations impliquant des facteurs de transcription, tels que les mutations d'*ETV6*, sont rares,⁽⁵⁴⁾ laissant les caractéristiques myéloprolifératives inexpliquées dans près de la moitié des cas. Cette problématique est similaire dans la TE triple négative à 15% et dans la MF triple négatif à 5% (**Figure 24**).

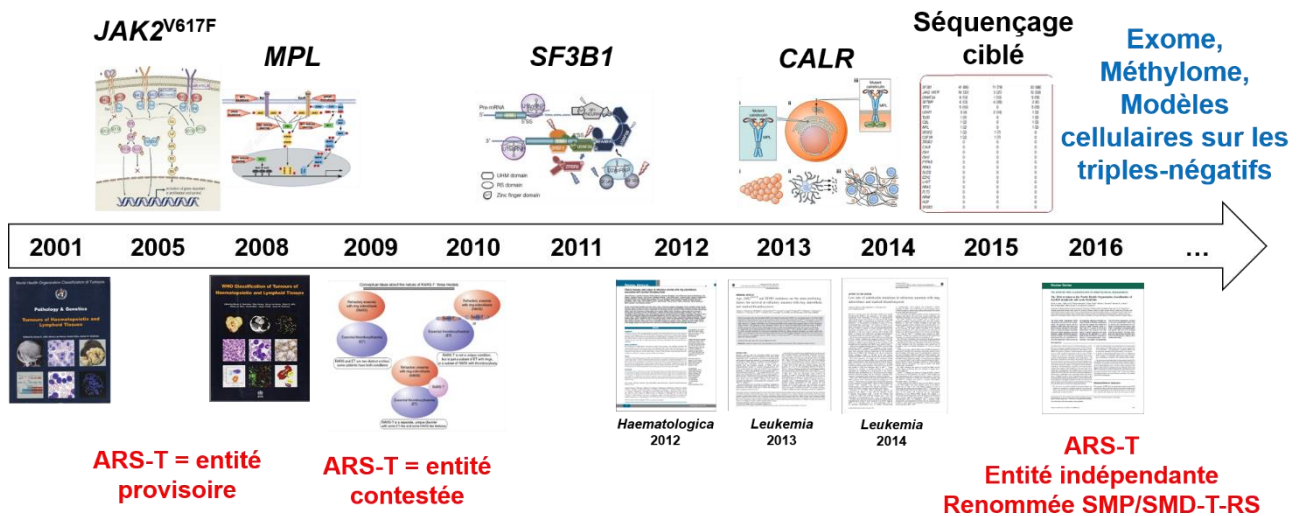


Figure 23. Projet de recherche SMP/SMD-T-SC avec perspectives actuelles : quels sont les déterminants de la thrombocytose dans les SMP/SMD-T-SC *JAK2*, *MPL* et *CALR* non mutés ?

Près de 50% des ARS-T ne présentent ni mutation de *JAK2*, ni mutation de *MPL*, ni mutation de *CALR*. L'enjeu actuel est donc d'identifier la ou les mutation(s) responsable(s) de la thrombocytose dans ces cas d'ARS-T. La suite logique serait de réaliser le séquençage de l'exome de nos cas d'ARS-T triples négatifs (Figures 23 et 24).

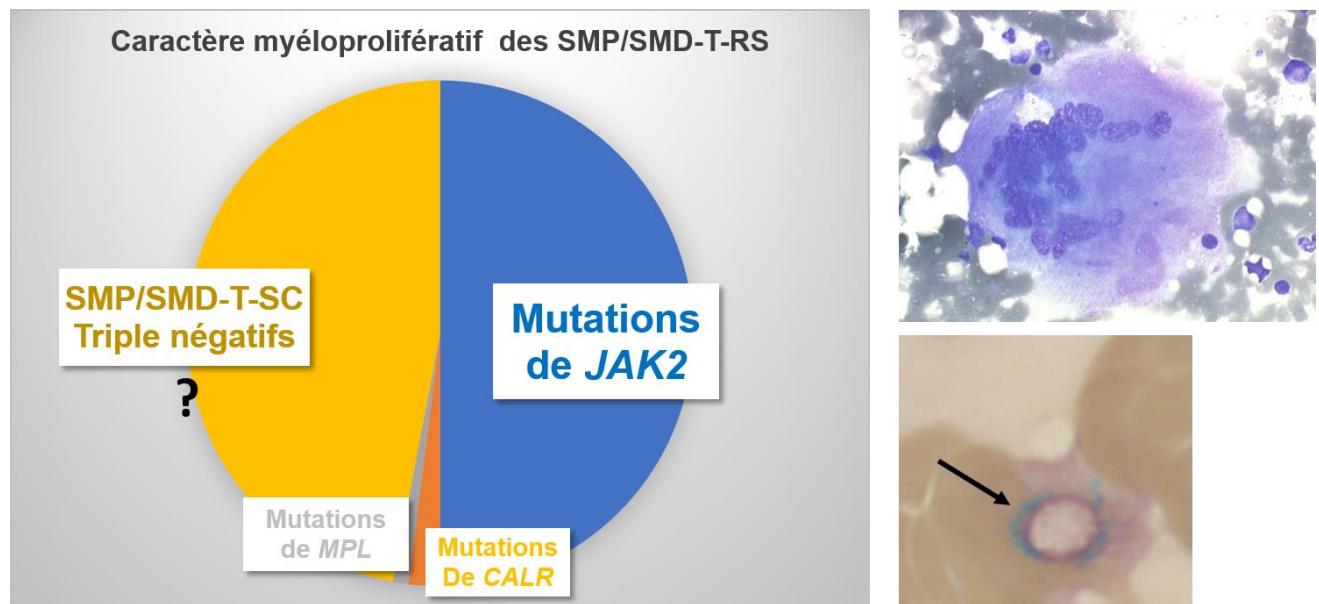


Figure 24. Caractériser les SMP/SMD-T-SC *SF3B1* mutées, *JAK2*^{WT}, *MPL*^{WT} et *CALR*^{WT} afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de la prolifération de la lignée mégacaryocytaire.

Le but de cette étude est d'identifier des mutations non encore identifiées qui pourraient expliquer les caractéristiques myéloprolifératives chez les SMD/P-T-RS triple négatifs (*JAK2*^{WT}, *MPL*^{WT}, *CALR*^{WT}).

Nous proposons donc de réaliser un séquençage d'exome complet, et de le réaliser sur une cohorte d'ARS-T triple-négatives pour les mutations de *JAK2*, *MPL* et *CALR*.

Nous disposons de deux groupes d'échantillons :

Dr Julien BROSEUS

Le premier groupe est constitué de 6 patients, sélectionnés par le Professeur François GIRODON au CHU de Dijon présentant une ARS-T triple-négative. Chaque échantillon sanguin issu d'un de ces 6 patients a été traité de manière à séparer les polynucléaires neutrophiles (PNN) des lymphocytes. Les lymphocytes T CD3+ ont été sélectionnés positivement par FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Nous disposons donc, pour chacun de ces 6 patients, d'ADN tumoral (issu des PNN) et d'ADN non tumoral (issu des lymphocytes T), permettant leur analyse comparative pour recenser les mutations somatiques. Il s'agit de la méthode de screening utilisée par Klampfl, qui a pour but d'identifier l'existence de mutations de *CALR* dans les TE et les MFP *JAK2* et *MPL* non-mutées.⁽²⁰⁾

Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur HiSeq 1000 (Illumina, San Diego, CA, États-Unis d'Amérique). A raison de 200 millions de *reads* par *Flow Cell* de 6 échantillons, la couverture était de 30 à 35 millions de clusters par exome en moyenne, ce qui est tout à fait satisfaisant. La lecture est faite en paired-end 2x100 pb, ce qui fait 2x20 millions de *reads* par exome. Ce séquençage a été réalisé sur la plateforme de séquençage à haut-débit de l'UMR 2008 (anciennement FR3209), sur le site de Nancy-Brabois.

L'analyse bio-informatique des résultats du séquençage a été réalisée par la plateforme de Bio-informatique de l'Unité Inserm-Université de Lorraine U1256 (anciennement U954), sur le site de la Faculté de Médecine de Nancy.

Le deuxième groupe est une cohorte de validation constituée de 42 patients, sélectionnés par le Professeur Thorsten HAFERLACH et le Docteur Sabine JEROMIN au MLL à Munich.

Les premiers résultats obtenus et les orientations sous-jacentes sont les suivants (**Figure 25**) :

- ***L'écrasante majorité des variants identifiés par l'analyse de l'exome sont des transversions C>A***, correspondant à la signature 18 présentée par d'autres types de cancer, notamment le neuroblastome. Cette signature est très inhabituelle dans ce contexte, et on attendrait plus volontiers une signature de vieillissement. Ce résultat a été acquis via une analyse d'exome et mérite d'être confirmé avec un séquençage *Whole Genome*, dans les limites imposées par la quantité de matériel restant et les fonds disponibles.
- ***Les anomalies somatiques affectant le gène *MUTYH* et/ou ses partenaires sont retrouvées dans les 6 cas de *SMP/SMD-SC-T* ayant fait l'objet d'un séquençage d'exome***. Ces anomalies ont été décrites dans des cancers solides, notamment le cancer colique, mais sous la forme de mutations germinales.
- ***La présence d'une duplication du gène *PTPN12* a été identifiée dans 3 des 6 échantillons ayant fait l'objet d'un séquençage d'exome (50%)***. Nos investigations actuelles ont pour objectif l'exploration fonctionnelle et les effets biologiques d'une surexpression de *PTPN12*, notamment sur la mégacaryopoïèse.
- ***Plus de 40 variants ponctuels ont été identifiés sur la cohorte de screening et plusieurs ont été confirmés sur la cohorte de validation (n=42), notamment *LMTK3*, *LTK* et *STAT5b****.

Dr Julien BROSEUS

Synthèse

Objectifs	Mise en évidence d'une ou plusieurs mutations affectant un ou des gènes dont la fonction est en rapport avec la transduction du signal, l'activation cellulaire, la prolifération cellulaire, la régulation épigénétique ou la résistance à l'apoptose. Identification de cibles thérapeutiques potentielles.
Partenaires	Pr François GIRODON (CHU de Dijon), <i>Munich Leukemia Laboratory</i> /MLL (Thorsten HAERLACH, Sabine JEROMIN), UMR Inserm-CNRS-UL2008 (Pr MOTORINE, Dr MARCHAND).
Étudiante M2	Marion Divoux (2017-2018)
Thèse d'Université	Marion Divoux (2018-2021)
Financement	Novartis : 15 000 euros (Julien BROSEUS, François GIRODON, Pierre FEUGIER)
État du projet	Les exomes du premier groupe ont été séquencés. Les exomes de la cohorte de validation ont été réalisés et les résultats sont en cours d'analyse. L'étape actuelle est la validation fonctionnelle des variants les plus prometteurs. Avis favorable du comité de suivi de Thèse pour l'inscription en 2 ^{ème} année.

Prix : Marion DIVOUX (Étudiante en Thèse d'Université – codirection avec le Professeur FEUGIER) : Prix de l'École Doctorale BioSE (Biologie Santé Environnement) pour son travail de Thèse (novembre 2019).

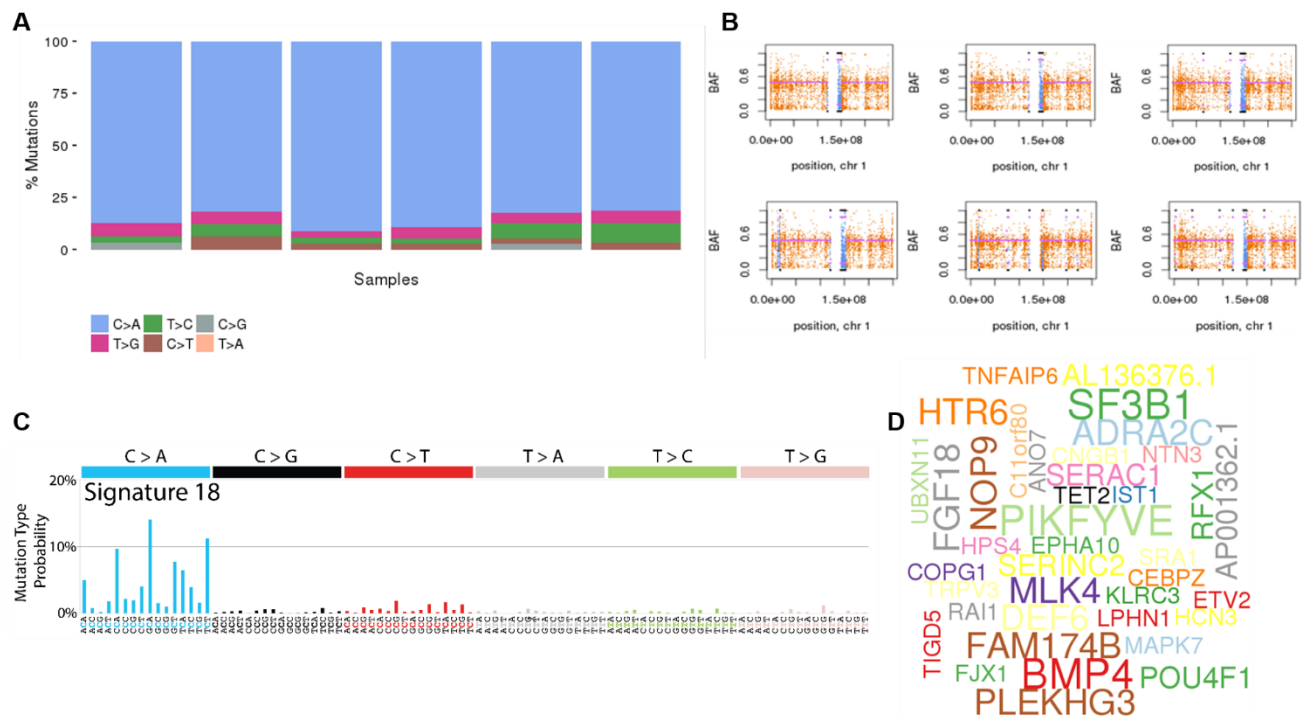


Figure 25. Premiers résultats de l'analyse de l'exome de 6 ARS-T triple négatives.

A) Prépondérance des tranversions C>A parmi les variants détectés. B) Forte prévalence des duplications du gène *PTPN12*. C) profil analogue à la signature 18, portée aussi par d'autres cancers, notamment le neuroblastome. D) Représentation des gènes les plus fréquemment mutés.

5.5.2. Étude méthylome/transcriptome des SMD avec excès de blastes traités par agents déméthylants.

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont les hémopathies malignes myéloïdes les plus fréquentes. Elles touchent majoritairement les sujets de plus de 65 ans et se manifestent par des cytopénies sanguines (anémie, neutropénie, thrombopénie), des anomalies morphologiques des cellules de la lignée myéloïde et dans certains cas par un excès de cellules blastiques sanguines et/ou médullaires.⁽⁵⁶⁾ Les SMD avec excès de blastes font partie des SMD de haut risque, qui présentent un risque élevé d'évolution vers une leucémie aiguë myéloblastique secondaire, dont le pronostic est très réservé.

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) constituent un ensemble de pathologies clonales de la cellule souche hématopoïétique caractérisées par l'accumulation d'anomalies cytogénétiques responsables d'une apoptose intra-médullaire et de cytopénies sanguines (anémies, neutropénies, thrombopénies). Les SMD sont les hémopathies malignes myéloïdes les plus fréquentes dans les pays industrialisés et représentent 13% des hémopathies malignes dans leur ensemble, en termes d'incidence annuelle. L'incidence annuelle des SMD est de 5 à 13 cas pour 100 000 habitants. Les SMD touchent essentiellement les sujets de plus de 65 ans, avec un âge médian au diagnostic de 71 à 76 ans.^(3, 56) Elles se manifestent par des cytopénies sanguines avec un risque parfois élevé d'évolution vers une leucémie aiguë myéloblastique (LAM) secondaire au pronostic sombre.

La grande variété des anomalies géniques rencontrées fait des myélodysplasies un groupe très hétérogène. Les SMD-EB sont les plus fréquents (30-40%) et posent le problème d'une évolution souvent rapide vers une LAM secondaire, au pronostic très sombre. Le score pronostique IPSS-R, fondé sur le nombre de cellules blastiques médullaires, le nombre et la nature des anomalies cytogénétiques et le nombre et la profondeur des cytopénies sanguines, permet de poser une indication thérapeutique dans les catégories de plus haut risque.^(200, 201)

Des troubles de la méthylation de l'ADN ont été décrits dans les SMD. Ils sont liés à des anomalies des gènes impliqués dans la régulation épigénétique, notamment *TET2* et *DNMT3a*.^(57, 202, 203) L'Azacytidine possède une double action, hypo-méthylante et cytotoxique, qui permet de restaurer l'hématopoïèse et d'obtenir une réponse dans 50% des cas.^(62, 204-206)

L'évaluation de l'efficacité de l'Azacytidine repose sur des critères cliniques et biologiques, déterminés par l'*International Working Group* (2006),⁽⁶⁰⁾ qui ne sont en général pas évaluables avant au moins six mois, car l'amélioration sanguine et médullaire est tardive.

Sur le plan physiopathologique, les SMD relèvent d'anomalies épigénétiques, en particulier de la dérégulation de la méthylation des gènes. La méthylation des gènes est un mécanisme post-répliatif impliquant d'une part les protéines de type histone, mais aussi les cytosines des régions régulatrices de l'expression génique. Ces anomalies englobent donc de nombreux promoteurs de gènes, avec pour conséquence une modification de leur niveau d'expression. Cette régulation est altérée dans de nombreuses pathologies tumorales dans lesquelles on retrouve un désordre de méthylation, avec une hypo-méthylation globale et une hyper-méthylation paradoxale des promoteurs contrôlant les gènes suppresseurs de tumeur. Ce processus a également été décrit dans les myélodysplasies.^(56, 58, 207)

Les cohortes de SMD étudiées dans la littérature rapportent dans la grande majorité des cas des mutations des gènes de l'épissage (notamment *SF3B1*) mais également des mutations des gènes de régulation de la méthylation tels que *TET2* (30%) et *DNMT3a* (10-15%).^(56, 57) Ces mutations entraînent des anomalies importantes dans les SMD, avec des profils de méthylation fortement altérés, caractérisés par une

Dr Julien BROSEUS

hypométhylation globale, mais une hyperméthylation des zones régulatrices de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur, entraînant leur sous-expression.⁽⁵⁶⁾

Il a également été démontré que la perte de *TET2* jouait un rôle favorisant dans la leucémogénèse. Elle entraîne notamment une hyperméthylation au niveau de promoteurs distaux tels que les enhanceurs.⁽⁵⁹⁾ Elle a également été reconnue comme facteur prédictif de bonne réponse aux agents hypométhylants pour les myélodysplasies et leucémies aiguës.^(202, 208, 209)

Les stratégies thérapeutiques actuelles reposent notamment sur l'utilisation d'agents « hypométhylants », la 5'-azacytidine (Azacytidine) en particulier. Ces molécules sont des analogues de la cytosine, incorporés dans l'ADN durant la phase S. Elles ont la propriété d'inhiber les DNMT par liaison covalente, puis en favorisant leur destruction par le protéasome. Leurs mécanismes d'action ne sont cependant que partiellement connus. L'utilisation de ces agents en monothérapie dans le contexte des SMD de mauvais pronostic permet d'obtenir une réponse complète et de restaurer l'hématopoïèse dans 20% des cas et d'obtenir une réponse partielle dans 30% des cas.^(205, 206)

Le traitement par 5'-azacytidine n'est cependant pas curatif en l'absence de greffe de cellules souches hématopoïétiques. Il provoque une aplasie médullaire et est maintenu jusqu'à progression (en l'absence d'indication de greffe). Le traitement est fondé sur la répétition de cycles de 4 semaines (injection journalière durant la première semaine du cycle, puis 3 semaines sans traitement) et les complications (infectieuses, hémorragiques ou liées à l'anémie) sont fréquentes en raison de la toxicité médullaire du produit.

L'évaluation de l'efficacité de la 5'-azacytidine est réalisée selon des critères cliniques et biologiques simples. Cependant, dans plus de 85% des cas, ces critères ne sont pas évaluables avant au moins 6 mois, en raison d'une amélioration médullaire et sanguine tardive (parfois plus d'un an après le début de la prise en charge). Or environ 50% des patients sont finalement considérés comme répondeurs, ce qui signifie que 50% des patients reste sous traitement durant plusieurs mois, sans bénéfice final.

L'analyse groupée de 3 études de phase II du CALGB (8421, 8921 et 9221), la médiane de délai de réponse (RC, RP et amélioration hématologique) a été de 3 mois, 85% des réponses survenant après le cycle n°6. Dans l'étude AZA-001, la médiane d'apparition des premières réponses était de 4 mois, 85% des réponses étant observées après les 6 premiers cycles.⁽²⁰⁵⁾

L'évaluation précoce de la réponse au traitement est au cœur des préoccupations actuelles. Aucun consensus n'a été atteint à ce jour pour prédire la réponse sur la base de paramètres biologiques parmi : (i) le statut mutationnel de gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN, (ii) la méthylation globale et la méthylation de *BCL2L10* et *CDKN2B*, (iii) l'expression de certains gènes, (iv) le niveau d'expression de certains miRNA, (v) l'expression de certaines protéines.⁽²⁰⁹⁾ De plus, les mécanismes moléculaires à l'origine de la réponse ou de la résistance au traitement restent à définir. Cela montre l'intérêt de l'étude MYRAGE (centrée sur les SMD les plus graves), dans un contexte où les indications de l'Azacytidine sont en constante expansion dans le domaine des SMD et des LAM.

Des marqueurs moléculaires précoces de réponse à la Décitabine, un autre agent hypo-méthylant, ont été récemment mis en évidence dans la leucémie myélo-monocytaire chronique, un syndrome mixte myéloprolifératif et myélodysplasique. Les auteurs ont identifié 167 régions de l'ADN dont le niveau de méthylation était variable selon les patients (DMR ou « *Differentially Methylated Regions* ») et l'analyse du profil global de méthylation de ces DMR a permis d'identifier des profils de méthylation corrélés à la réponse à la Décitabine⁽⁶²⁾ et à l'Azacytidine.⁽²¹⁰⁾

Parmi les études réalisées jusqu'alors, un grand nombre ont été réalisées in vitro et/ou ont été menées sur des petits groupes hétérogènes de patients et/ou se sont limitées à la méthylation des promoteurs géniques et/ou se sont limitées à une prédiction de la réponse au traitement sur la base du profil de méthylation au diagnostic.

Dr Julien BROSEUS

Elles n'ont identifié qu'un nombre limité de régions dont le profil de méthylation pourrait constituer un marqueur précoce de réponse.

Une étude d'envergure a été réalisée sur la LMMC,⁽⁶²⁾ mais s'est limitée à la recherche de marqueurs de réponse identifiables au diagnostic. Par ailleurs, la LMMC est une maladie plus rare que les SMD avec excès de blastes, dont l'incidence est en constante augmentation en raison de l'allongement de la durée de vie.

Compte-tenu du temps nécessaire pour l'incorporation de l'Azacytidine dans le génome des cellules tumorales, notre hypothèse est qu'une exposition à 3 cycles de traitement est nécessaire pour voir l'apparition de marqueurs précoces de réponse à l'Azacytidine. La recherche de marqueurs prédictifs de réponse dès le diagnostic reste très pertinente, et n'a jamais été réalisée dans le contexte des SMD de haut risque avec excès de blastes. Aussi, l'analyse comparative et séquentielle du profil de méthylation génique, au diagnostic et après 3 cycles de traitement, peut permettre d'identifier des marqueurs précoces de réponse au traitement par Azacytidine.

Enfin, l'analyse du transcriptome par séquençage haut débit de l'ARN au diagnostic et après 3 mois de traitement permettra de mieux comprendre (i) les conséquences des modifications du profil de méthylation, et (ii) les mécanismes de résistance tumorale et enfin (iii) d'ouvrir la voie à de nouveaux traitements plus efficaces.

Notre étude est originale et innovante en ceci qu'elle comprend une analyse comparative du méthylome et du transcriptome au diagnostic et après 3 mois d'Azacytidine, ce qui permet de prendre en compte les effets du traitement. Il s'agit d'une étude clinique prospective dont le processus est simple et suit le parcours hospitalier des patients. Toutes les autorisations réglementaires ont été obtenues. Elle implique une collaboration scientifique avec une unité Inserm (U1256) spécialisée dans ce type d'analyse, sur le plan technique comme sur le plan bio-informatique.

L'hétérogénéité intra et inter-patients de la méthylation de l'ADN dans les SMD et dans les LAM est un aspect à prendre en compte.^(211, 212) Ces 2 études présentent des buts et des méthodologies différentes de notre travail. La première porte sur des modèles murins et compare le profil de méthylation de souris malades avec celui de souris saines. Le deuxième article porte sur les leucémies aiguës myéloblastiques, une pathologie connue pour présenter un profil d'anomalies du méthylome plus complexe que les syndromes myélodysplasiques.

Il faut toutefois prendre en compte le fait que les syndromes myélodysplasiques constituent un ensemble hétérogène et notre plan expérimental est conçu pour maîtriser cette hétérogénéité :

- Nous nous focalisons sur un seul type de syndrome myélodysplasique, le plus fréquent et le plus pertinent car éligible à un traitement hypométhylant.
- Nous ne comparons pas des sujets malades à des sujets sains, mais bien deux groupes de sujets présentant la même maladie, mais une sensibilité différente au traitement. Nous pensons donc que l'hétérogénéité sera moindre.
- La grande quantité de données générées constitue une sécurité donnant plus de significativité aux études statistiques, permettant de faire la part des choses entre variabilité liée à la méthode ou à l'analyse et véritable substrat biologique.

L'effectif choisi pour notre étude est important comparativement à ceux que l'on trouve dans la littérature⁽²¹⁰⁾ et il est comparable à celui d'une des études de référence dans ce contexte.⁽⁶²⁾ C'est l'effectif le plus important à ce jour pour une étude clinique prospective sur les SMD-EB. Compte tenu de la maîtrise de l'hétérogénéité inter-échantillons par le protocole, un effectif de 16 patients par groupe devrait permettre de dégager des DMR communs. Par ailleurs, les critères utilisés pour définir le statut répondeur/non répondeur,

Dr Julien BROSEUS

définis par Cheson en 2006 sont clairs, et largement détaillés sur le formulaire de recueil des données cliniques (e-CRF).

Le projet s'inscrit parfaitement dans l'axe de recherche du CHRU sur le vieillissement. La capacité de recrutement de Nancy, évaluée sur une longue période, est de 2 à 4 patients par mois. Une durée de recrutement de 24 mois permettra de recruter 44 patients, avec une marge d'erreur confortable. L'étude a été autorisée par le CPP et l'ANSM. La dynamique existante autour de ce projet (service d'Hématologie Clinique, service d'Hématologie Biologique, CRB Lorrain, Inserm U1256) nous amène à penser que les inclusions seront réunies dans le délai annoncé. Ce projet réunit toutes les compétences nécessaires incluant des cliniciens, des biologistes médicaux, des chercheurs, des biostatisticiens et des bioinformaticiens (**Figure 26**).

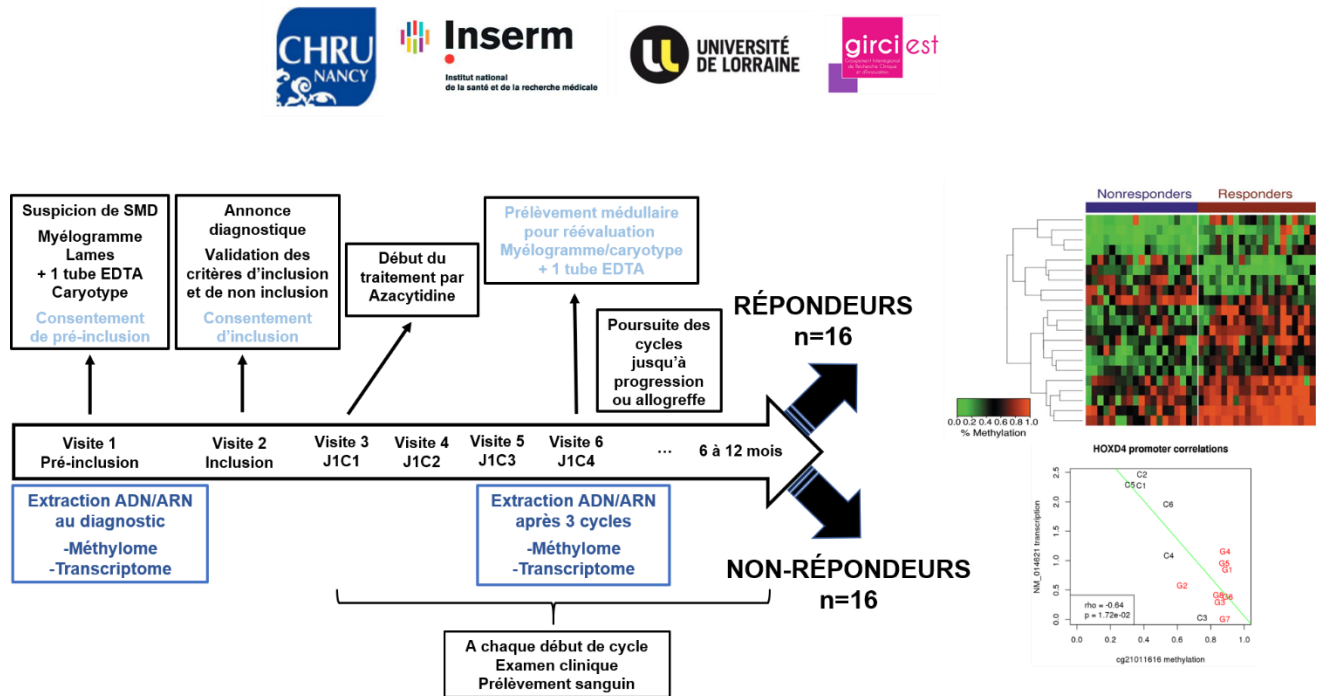


Figure 26. Présentation du projet MYRAGE (Myélodysplasies de haut Risque sous Azacytidine, Génétique et Épigénétique).

Synthèse

Projet

MYRAGE (Myélodysplasies de haut Risque, étude Génétique et Épigénétique). Caractérisation des modifications du méthylome et du transcriptome dans les SMD de haut risque avec excès de blastes.

Objectifs

Comparer, entre répondeurs et non répondeurs à l'Azacytidine, les « Differentially Methylated Regions » dont le niveau de méthylation a changé entre le diagnostic et la fin du 3ème cycle mensuel de traitement, afin d'identifier précocement des profils de DMR prédictifs de la réponse à l'Azacytidine, dans les SMD de haut risque avec excès de blastes.

Identifier dès le diagnostic, les profils de méthylation des DMR qui sont prédictifs de la réponse à l'Azacytidine (évaluée après 6 à 12 cycles) dans les SMD de haut risque avec excès de blastes.

Financements

Association des Chefs de Services du CHRU de Nancy : 7 000 euros

Inserm U1256 : 11 000 euros

Dr Julien BROSEUS

GIRCI jeune chercheurs : 50 000 euros (Julien BROSEUS)

État du projet

Inclusions dans l'étude depuis décembre 2018.
21 inclusions au 9/8/2020

Dr Julien BROSEUS

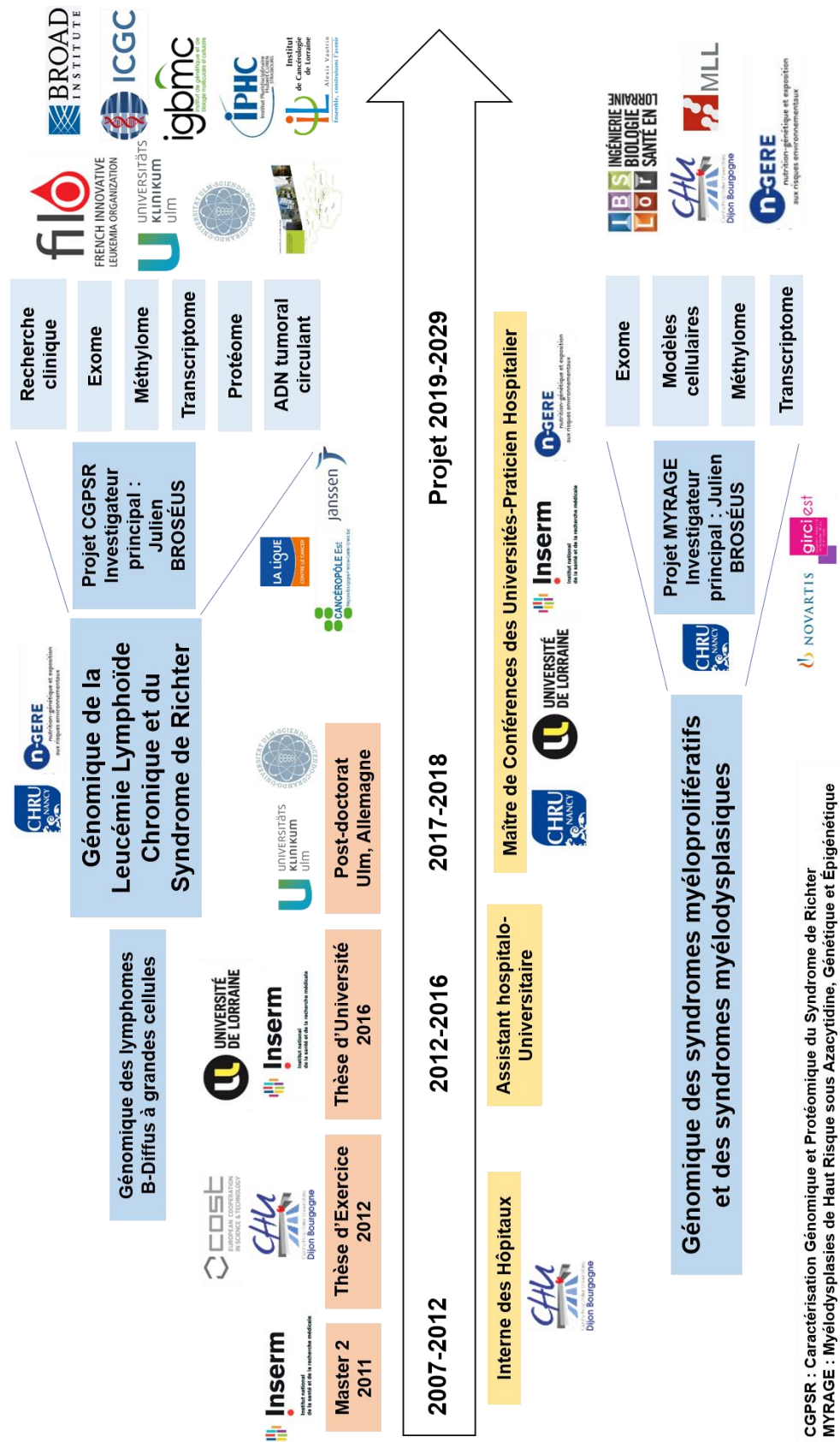


Figure 27. Présentation du parcours sur les 10 ans passés et du projet scientifique pour les 10 ans à venir, incluant les thématiques d'expertise, les partenariats scientifiques et les sources de financement.

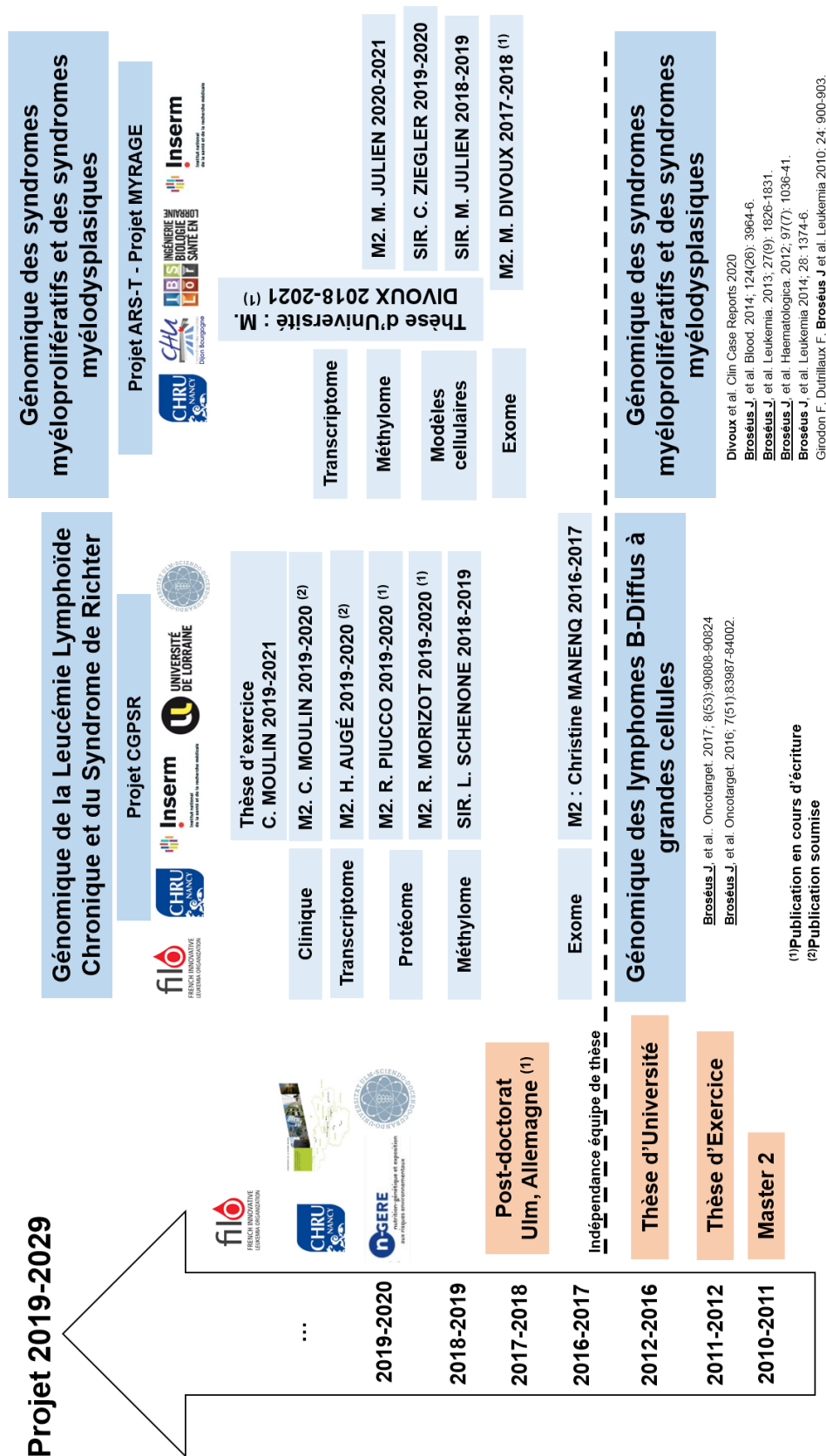


Figure 28. Présentation du parcours sur les 10 ans passés et du projet scientifique pour les 10 ans à venir, incluant les thématiques d'expertise, les partenariats scientifiques, les encadrements d'étudiants et les publications acceptées, soumises et en préparation.

6. RESPONSABILITÉS – CONTRATS

6.1. Bourses d'études

- **Association des Chefs de Service du CHRU de Nancy** : bourse de soutien à la mobilité des jeunes médecins 2017-2018.
- **Cancéropôle Est** : "*Young Researcher Cross Border Mobility Fellowship*" 2017-2018.
- **SILLC** (Association de Soutien et d'Information à la Leucémie Lymphoïde Chronique et à la Maladie de Waldenström) : bourse de soutien à la mobilité des jeunes médecins 2017-2018.

6.2. Financements de projets de recherche

- **Financement NOVARTIS** : 15 000 euros pour le projet sur les MDS/MPN-RS-T (Julien Broséus, Pierre Feugier, Francois GIRODON).
- **Financement du Cancéropôle Est** : 20 000 euros pour le projet d'étude transcriptomique du Syndrome de Richter (Julien Broséus).
- **Financement de la Ligue contre le Cancer** : 30 000 euros pour le projet d'étude transcriptomique du Syndrome de Richter (Pierre Feugier, Julien Broséus).
- **Financement de la Ligue contre le Cancer** : 23 700 euros pour le projet d'étude protéomique du Syndrome de Richter (Julien Broséus, Pierre Feugier, Aurore Perrot).
- **Financement du CHRU de Nancy** : 20 000 euros pour le projet Richter (Julien Broséus, Pierre Feugier).
- **Financement FORCE HEMATO 2018** : 50 000 euros pour le projet Évolution clonale dans la LLC et le Syndrome de Richter (Julien Broséus, Pierre Feugier et Romain Gueze pour le groupe FILO).
- **Financement par le GIRCI Est jeunes chercheurs 2018** : 50 000 euros pour le projet méthylome/transcriptome dans les SMD sous Azacytidine (Julien Broséus).
- **Financement par JANSSEN en 2019** : 15 000 euros pour les différents volets du projet Richter

6.3. Demandes en cours

- **GIRCI Est jeunes chercheurs 2020 (Dr Marie MULLER)** : 50 000 euros pour le projet SMILE : étude du transcriptome des LBDGC survenant en contexte de maladie inflammatoire chronique de l'intestin traitée par immunosuppresseurs.

6.4. Appartenance à des réseaux de recherche disposant d'un budget propre

- **FILO** : *French Innovative Leukemia Organization*

7. COLLABORATIONS

7.1. Collaborations locales, regionales et nationales

	Partenaires	Projets
<p>CHRU de Nancy</p> 	<p>Direction de la Recherche et de l'Innovation Madame Véronique SAUNIER, cheffe de Projets</p> <p>Centre de Ressources Biologiques Lorrain Madame Sandra LOMAZZI, Responsable opérationnelle</p> <p>Plate-forme d'aide à la Recherche Clinique (PARC) Docteur Cédric BAUMANN</p>	<p>Projets de recherche (correspond aux points : 5.2. ; 5.3. ; 5.4. et 5.5.2).</p> <p>CGPSR (Caractérisation Génomique et Protéomique du syndrome de Richter)</p> <p>MYRAGE (Myélodysplasies de haut Risque sous Azacitidine, Génétique et Épигénétique)</p>
<p>FILO</p>  <p>FRENCH INNOVATIVE LEUKEMIA ORGANIZATION</p>	<p>Pr Véronique LEBLOND (La Pitié-Salpêtrière, Paris)</p> <p>Pr Pierre FEUGIER (Nancy)</p> <p>Pr Alain DELMER (Reims)</p> <p>Pr Florence CYMBALISTA (Avicenne, Bobigny)</p> <p>Pr Romain GUIEZE (Clermont-Ferrand)</p> <p>Pr Olivier TOURNILHAC (Clermont-Ferrand)</p> <p>Dr Anne-Sophie MICHALLET (Lyon)</p> <p>Dr Stéphane LEPRETRE (Rouen)</p>	<p>Projets de recherche : Leucémie Lymphoïde Chronique et Syndrome de Richter</p> <p>Correspond aux points : 5.2 ; 5.3 et 5.4.</p>
<p>CHU de Dijon</p>  <p>Centre Hospitalier Universitaire Dijon Bourgogne</p>	<p>Pr François GIRODON</p>	<p>Syndromes mixtes myéloprolifératifs/myélodysplasiques triples négatifs.</p> <p>Correspond au point 5.5.1.</p>
<p>IGBMC (Strasbourg)</p>  <p>institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire</p>	<p>Christelle THIBAUT, Responsable opérationnelle de la plateforme de séquençage.</p> <p>Céline KEIME, Responsable de l'équipe de Bio-informatique.</p>	<p>Caractérisation transcriptomique du syndrome de Richter</p>
<p>Institut Hubert Curien (Strasbourg)</p>  <p>Institut Pluridisciplinaire Hubert CURIEN STRASBOURG</p>	<p>Dr Christine CARAPITO</p> <p>Dr Sarah CIANFERRANI</p> <p>Dr Luc-Matthieu FORNECKER</p>	<p>Caractérisation protéomique du syndrome de Richter</p>
<p>Institut de Cancérologie de Lorraine</p>  <p>Institut de Cancérologie de Lorraine Alexis Vautrin Ensemble, construisons l'avenir</p>	<p>Pr Jean-Louis MERLIN</p> <p>Dr Alexandre HARLÉ</p>	<p>ADN tumoral circulant dans le Syndrome de Richter.</p> <p>Correspond au point 5.4.2</p>

Tableau 16. Collaborations locales, régionales et nationales**7.2. Collaborations internationales**

	Partenaires	Projets
Université et Clinique Universitaire d'Ulm (Allemagne) 	Pr Stephan STILGENBAUER Pr Rainer SIEBERT Pr Daniel MERTENS Dr Eugen TAUSCH Dr Annika SCHEFFOLD Dr Rabea WAGENER Dr Billy CHELLIAH	Evolution tumorale spontanée dans le Leucémie Lymphoïde chronique Profils de méthylation dans le Syndrome de Richter
Université de la Grande Région 	Pr STILGENBAUER (Hombourg) Pr FEUGIER (Nancy) Pr BEGUIN (Liège) Pr ROMER (Hombourg) Dr THURNER (Hombourg) Dr BROSEUS (Nancy) Dr PAGETTI (Luxembourg) Dr BERCHEM (Luxembourg) Dr MOUSSAY (Luxembourg)	Recherche fondamentale et translationnelle sur la Leucémie Lymphoïde Chronique et les Lymphomes
SYSTreat-CLL	Dr VARIN (Inserm U978) Pr CYMBALISTA (Paris 13, Inserm U978) Pr STILGENBAUER (Ulm / Hombourg) Pr MERTENS (Ulm, Heidelberg) Pr SEIFFERT (Heidelberg) Pr FEUGIER (Nancy) Pr SOUSSI (Karolinska Universitets Sjukhus) Pr HELDERING (Academisch Medisch Centrum Amsterdam) Dr Carsten NIEMANN (Rigshospitalet, Copenhage) Dr Julien BROSEUS (Nancy)	<i>Integrated systems modelling of omics, cellular function and clinical phenotype to personalize combinatorial treatment in chronic lymphocytic leukemia</i>
COST 	Pr GIRODON (Dijon) Dr HERMOUET (Nantes) Pr LIPPERT (Brest) Pr BESSES (Barcelone) Pr FLORENSA (Barcelone) Pr SCHNITTGER (Munich) Pr HAFERLACH (Munich) Pr KRALOVICS (Vienne)	Syndromes myéloprolifératifs Syndromes mixtes myéloprolifératifs/myélodysplasiques

Tableau 17. Collaborations internationales

8. Atteinte des pré-requis du CNU 47-01

8.1.1. Critères CNU (juillet 2019)

RECRUTEMENT des PU-PH et des MCU-PH

Sous-section 4701 du CNU : Hématologie ; Transfusion

PRE-REQUIS

A. Pour les MCU-PH :

- Deux années effectives d'enseignement de l'Hématologie, ou de disciplines proches, dans la formation Licence Master avec une attestation du nombre d'heures réalisées, validée par le responsable des enseignements ou le Doyen de l'UFR.

Et

- Un minimum de deux publications, sous forme d'article original (lettres et revues exclues), avec une cohérence thématique, signées en premier ou co-premier auteur ou en dernier auteur, dans des revues de facteur d'impact supérieur à 3 au moment de la publication.

B. Pour les PU-PH :

- Trois années effectives d'enseignement de l'Hématologie, ou de disciplines proches, dans la formation Licence Master avec une attestation du nombre d'heures réalisées, validée par le responsable des enseignements ou le Doyen de l'UFR.

Et

- Un minimum de 4 publications, sous forme d'articles original (lettres et revues exclues), signées en premier auteur ou en dernier dans des revues de facteur d'impact supérieur à 3 au moment de la publication.
- Deux articles au moins parmi ces publications devront être publiés dans une revue ayant un facteur d'impact supérieur à 5 au moment de la publication.

Et obligation de mobilité d'au moins 12 mois

- Une mobilité réalisée en France devra l'être dans le domaine exclusif de la recherche.
- La mobilité à l'étranger s'envisage soit dans une structure de recherche, soit dans un service de renom, pour une mobilité clinique.

Remarques importantes concernant l'évaluation du prérequis en matière de publication :

- *Problème des revues prédatrices : les revues reconnues comme prédatrices à partir de 2019 ne pourront être prise en considération.*

- *Les lettres à l'éditeur ne sont classiquement pas prises en compte dans l'évaluation des dossiers, mais la sous-section a décidé d'assouplir sa position vis-à-vis des grandes revues (Lettres originales ; à l'exception des lettres de réponse à un article précédemment publié).*

C. Pour les MCU-PH et PU-PH :

- Le jury s'autorise la possibilité d'une visite sur site avant le concours.
- Les pré-requis pour les pharmaciens sont identiques à ceux des médecins.
- Pour les candidats de formation scientifique exclusive : le niveau exigé est équivalent à celui demandé pour devenir CR1 (Chargé de Recherche) des EPST pour les candidats MCU-PH et DR2 (Directeur de Recherche) pour les candidats PU-PH. Les capacités pédagogiques doivent être de niveau identique à celui requis pour les candidats médecins ou pharmaciens. Le candidat devra présenter un projet hospitalier cohérent, validé par le président de CME (ou de la CCM).
- Ces éléments représentent le minimum requis pour être candidat ; la sous-section se réserve la possibilité d'exiger des conditions complémentaires, en fonction du profil, de l'âge, ou des orientations dans la spécialité, tenant compte, en particulier, de la dynamique de publication et de la notion de production récente.

Le respect de ces critères ne préjuge en rien des décisions qui seront prises par le jury après audition du candidat, audition qui comporte notamment au plan pédagogique

Juillet 2019

Dr Julien BROSEUS

8.1.2. Enseignement (Cf document SIAPS)

Le tableau SIAPS du candidat montre que les pré-requis en termes d'enseignement sont largement atteints (cf tableau 6, pages 31-32).

8.1.3. Publications

Les pré-requis sont atteints puisque le candidat a 5 publications de facteur d'impact > 5 en tant que premier auteur.

8.1.4. Mobilité internationale



Sous-section 47-01 Hématologie Transfusion

PU-PH

Mme AJCHENBAUM-CYMBALISTA Florence
Mr LAMY de la CHAPELLE Thierry
Mme LEBLOND Véronique
Mr MORANGE Pierre-Emmanuel
Mr SOCIE Gérard
(Président sous-section 47-01)
Mme UGO Valérie

MCU-PH

Mme CHAPIRO Elise
Mr De BOTTON Stéphane
Mme GIANILY-BLAIZOT Muriel
Mr GUILLET Benoît
Mme LEGROS Laurence
Mme LOOSVELD Marie

Je soussigné, Professeur Gérard SOCIE, Président de la sous-section 4701 du CNU, certifie que le stage effectué par le Docteur Julien BROSEUS, dans le Laboratoire du Professeur STILGENBAUER du 30/10/2017 au 2/11/2018 inclus, à ULM en Allemagne dans le cadre d'un stage post-doctoral, permet la validation de la mobilité hors CHU en accord avec les prérequis de la sous-section 4701 du CNU (hématologie- transfusion)

Certificat à Paris fait ce jour, le 15/04/2019, à la demande de l'intéressée pour servir et faire valoir ce que de droit.

Professeur Gérard SOCIE

Président de la sous-section 4701 du CNU

Figure 29. Attestation de validation de la Mobilité Internationale en accord avec les prérequis de la sous-section 47-01 du CNU.

Dr Julien BROSEUS

9. ANNEXES

9.1. Publications (5 majeures)

Broséus J, Mourah S, Ramstein G, *et al.* VEGF121 is predictor for survival in activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma and is related to an immune response gene signature conserved in cancers. *Oncotarget*. **2017**; 8(53):90808-90824.

Broséus J, Chen G, Hergalant S, *et al.* Relapsed diffuse large B-cell lymphoma present different genomic profiles between early and late relapses. *Oncotarget*. **2016**; 7(51):83987-84002.

Broséus J, Park JH, Carillo S, *et al.* Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. *Blood*. **2014**; 124(26): 3964-6.

Broséus J, Alpermann T, Wulfert M, *et al.* MPN and MPN_r-EuroNet (COST Action BM0902). Age, JAK2V617F and SF3B1 mutations are the main predicting factors for survival in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*. **2013**; 27(9): 1826-1831.

Broséus J, Florensa L, Zipperer E, *et al.* Clinical features and course of refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*. **2012**; 97(7): 1036-41.

9.2. Publications d'encadrement de M2 ou de Thèse

Manenq C, Lesesve JF, Dreumont N, Massin F, Salignac S, Mansuy L, Chastagner P, Latger-Cannard V, **Broséus J**. Combined use of multiparametric flow cytometry and cytomorphology to enhance detection of neuroblastoma metastatic cells in bone marrow. *Int J Lab Hematol*. **2020**; 42:52-60.

Divoux M, Plocque A, Sevin M, Voillat L, Guerci-Bresler A, Girodon F and **Broséus J**. Efficacy of Lenalidomide in Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms with Ring Sideroblasts and an extreme platelet count. *Clin Case Rep*. **2020**. DOI: 10.1002/ccr3.3026.

Moulin C, Morizot R, Remen T, Augé H, Bouclet F, Lomazzi S, Dartigeas C, Quinquenel A, Busby H, Tomowiak C, Leblond V, Thieblemont C, Cymbalista F, Béné MC, Guièze R, **Broséus J***, Feugier P*. Clinical and Biological Characteristics and Outcomes of Richter Transformation: A French Multicenter Study from the Filo Group. Annual meeting of the American Society of Hematology, Orlando, 2019. https://ashpublications.org/blood/article/134/Supplement_1/4112/424341/

Dr Julien BROSEUS

10. BIBLIOGRAPHIE

1. Maynadié M, Girodon F, Manivet-Janoray I, Mounier M, Mugneret F, Bailly F, et al. Twenty-five years of epidemiological recording on myeloid malignancies: data from the specialized registry of hematologic malignancies of Cote d'Or (Burgundy, France). *Haematologica*. 2011;96(1):55-61.
2. Vardiman J, Brunning R, Arber D, Le Beau M, Porwit A, Tefferi A, et al. Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In: Swerdlow S, Campo E, Lee Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al., editors. *World Health Organization Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues 4th ed.* Lyon, France: IARC; 2008. p. 18-30.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
4. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-8.
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054-61.
6. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-90.
7. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-97.
8. Boissinot M, Garand R, Hamidou M, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood*. 2006;108(5):1781-2.
9. Ceesay MM, Lea NC, Ingram W, Westwood NB, Gäken J, Mohamedali A, et al. The JAK2 V617F mutation is rare in RARS but common in RARS-T. *Leukemia*. 2006;20(11):2060-1.
10. Remacha AF, Nomdedéu JF, Puget G, Estivill C, Sarda MP, Canals C, et al. Occurrence of the JAK2 V617F mutation in the WHO provisional entity: myelodysplastic/myeloproliferative disease, unclassifiable-refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*. 2006;91(5):719-20.
11. Renneville A, Quesnel B, Charpentier A, Terriou L, Crinquette A, Lai JL, et al. High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia*. 2006;20(11):2067-70.
12. Steensma DP, Caudill JS, Pardanani A, McClure RF, Lasho TL, Tefferi A. MPL W515 and JAK2 V617 mutation analysis in patients with refractory anemia with ringed sideroblasts and an elevated platelet count. *Haematologica*. 2006;91(12 Suppl):ECR57.
13. Szpurka H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, Hsi ED, Theil KS, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood*. 2006;108(7):2173-81.
14. Wang SA, Hasserjian RP, Loew JM, Sechman EV, Jones D, Hao S, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia*. 2006;20(9):1641-4.
15. Gattermann N, Billiet J, Kronenwett R, Zipperer E, Germing U, Nollet F, et al. High frequency of the JAK2 V617F mutation in patients with thrombocytosis (platelet count >600x10⁹/L) and ringed sideroblasts more than 15% considered as MDS/MPD, unclassifiable. *Blood*. 2007;109(3):1334-5.

Dr Julien BROSEUS

16. Raya JM, Arenillas L, Domingo A, Bellosillo B, Gutiérrez G, Luño E, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with thrombocytosis: comparative analysis of marked with non-marked thrombocytosis, and relationship with JAK2 V617F mutational status. *Int J Hematol.* 2008;88(4):387-95.
17. Pardnani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood.* 2006;108(10):3472-6.
18. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Dengler R, Kröber A, Kern W, et al. Detection of an MPLW515 mutation in a case with features of both essential thrombocythemia and refractory anemia with ringed sideroblasts and thrombocytosis. *Leukemia.* 2008;22(2):453-5.
19. Cross NC. Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:208-14.
20. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 2013.
21. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013.
22. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, Buduo CA, Milanese C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2016;30(2):431-8.
23. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood.* 2016;127(10):1317-24.
24. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016;127(10):1307-16.
25. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood.* 2016;127(10):1325-35.
26. Cazzola M. Mutant calreticulin: when a chaperone becomes intrusive. *Blood.* 2016;127(10):1219-21.
27. Girodon F, Dutrillaux F, Broséus J, Mounier M, Goussot V, Bardonnaud P, et al. Leukocytosis is associated with poor survival but not with increased risk of thrombosis in essential thrombocythemia: a population-based study of 311 patients. *Leukemia.* 2010;24(4):900-3.
28. Mughal TI, Cross NC, Padron E, Tiu RV, Savona M, Malcovati L, et al. An International MDS/MPN Working Group's perspective and recommendations on molecular pathogenesis, diagnosis and clinical characterization of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 2015;100(9):1117-30.
29. Vardiman J, Bennett J, Bain B, Baumann I, Thiele J, Orazi A. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, unclassifiable. In: Swerdlow S, Campo E, Lee Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al., editors. *World Health Organization Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th ed.* Lyon, France: IARC; 2008. p. 85-6.
30. Shaw GR. Ringed sideroblasts with thrombocytosis: an uncommon mixed myelodysplastic/myeloproliferative disease of older adults. *Br J Haematol.* 2005;131(2):180-4.
31. Broseus J, Florensa L, Zipperer E, Schnittger S, Malcovati L, Richebourg S, et al. Clinical features and course of refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica.* 2012;97(7):1036-41.
32. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature.* 2011;478(7367):64-9.
33. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boulton J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med.* 2011;365(15):1384-95.

Dr Julien BROSEÚS

34. Damm F, Thol F, Kosmider O, Kade S, Löffeld P, Dreyfus F, et al. SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes: clinical associations and prognostic implications. *Leukemia*. 2012;26(5):1137-40.
35. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, Boulwood J, Della Porta MG, Pascutto C, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6239-46.
36. Jeromin S, Haferlach T, Grossmann V, Alpermann T, Kowarsch A, Haferlach C, et al. High frequencies of SF3B1 and JAK2 mutations in refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis strengthen the assignment to the category of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2013;98(2):e15-7.
37. Broséus J, Alpermann T, Wulfert M, Florensa Brichs L, Jeromin S, Lippert E, et al. Age, JAK2(V617F) and SF3B1 mutations are the main predicting factors for survival in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1826-31.
38. Broséus J, Lippert E, Harutyunyan AS, Jeromin S, Zipperer E, Florensa L, et al. Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*. 2014.
39. Visconte V, Makishima H, Jankowska A, Szpurka H, Traina F, Jerez A, et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*. 2012;26(3):542-5.
40. Broséus J, Park JH, Carillo S, Hermouet S, Girodon F. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. *Blood*. 2014;124(26):3964-6.
41. Broséus J, Lippert E, Harutyunyan AS, Jeromin S, Zipperer E, Florensa L, et al. Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*. 2014;28(6):1374-6.
42. Guglielmi C, Gomez F, Philip T, Hagenbeek A, Martelli M, Sebban C, et al. Time to relapse has prognostic value in patients with aggressive lymphoma enrolled onto the Parma trial. *J Clin Oncol*. 1998;16(10):3264-9.
43. Thieblemont C, Gisselbrecht C. Second-line treatment paradigms for diffuse large B-cell lymphomas. *Curr Oncol Rep*. 2009;11(5):386-93.
44. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh Gill D, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4184-90.
45. Thieblemont C, Briere J, Mounier N, Voelker HU, Cuccuini W, Hirchaud E, et al. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J Clin Oncol*. 2011;29(31):4079-87.
46. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(1):12-23.
47. Jardin F. Next generation sequencing and the management of diffuse large B-cell lymphoma: from whole exome analysis to targeted therapy. *Discov Med*. 2014;18(97):51-65.
48. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015;125(1):22-32.
49. Novak AJ, Asmann YW, Maurer MJ, Wang C, Slager SL, Hodge LS, et al. Whole-exome analysis reveals novel somatic genomic alterations associated with outcome in immunochemotherapy-treated diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 2015;5:e346.
50. Mareschal S, Dubois S, Viailly PJ, Bertrand P, Bohers E, Maingonnat C, et al. Whole exome sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016;55(3):251-67.
51. Morin RD, Assouline S, Alcaide M, Mohajeri A, Johnston RL, Chong L, et al. Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2016;22(9):2290-300.

Dr Julien BROSEUS

52. Broséus J, Chen G, Hergalant S, Ramstein G, Mounier N, Guéant JL, et al. Relapsed diffuse large B-cell lymphoma present different genomic profiles between early and late relapses. *Oncotarget*. 2016;7(51):83987-4002.
53. Broséus J, Mourah S, Ramstein G, Bernard S, Mounier N, Cuccuini W, et al. VEGF. *Oncotarget*. 2017;8(53):90808-24.
54. Jeromin S, Haferlach T, Weissmann S, Meggendorfer M, Eder C, Nadarajah N, et al. Refractory anemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis cases harbor mutations in SF3B1 or other spliceosome genes accompanied by JAK2V617F and ASXL1 mutations. *Haematologica*. 2015;100(4):e125-7.
55. Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, King RL, Ketterling RP, et al. Predictors of survival in refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis (RARS-T) and the role of next-generation sequencing. *Am J Hematol*. 2016;91(5):492-8.
56. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(1):5-19.
57. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-301.
58. Santini V, Melnick A, Maciejewski JP, Duprez E, Nervi C, Cocco L, et al. Epigenetics in focus: pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(2):231-45.
59. Rasmussen KD, Jia G, Johansen JV, Pedersen MT, Rapin N, Bagger FO, et al. Loss of TET2 in hematopoietic cells leads to DNA hypermethylation of active enhancers and induction of leukemogenesis. *Genes Dev*. 2015;29(9):910-22.
60. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 2006;108(2):419-25.
61. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, Lin E, Shan J, Huang X, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2010;28(4):605-13.
62. Meldi K, Qin T, Buchi F, Droin N, Sotzen J, Micol JB, et al. Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2015;125(5):1857-72.
63. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30.
64. Binet JL, Leparrier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*. 1977;40(2):855-64.
65. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-56.
66. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2017;92(9):946-65.
67. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-7.
68. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-54.
69. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.

Dr Julien BROSEUS

70. Ouillette P, Collins R, Shakhan S, Li J, Peres E, Kujawski L, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(11):3051-61.
71. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Bühler A, Zenz T, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*. 2012;120(24):4783-94.
72. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101-5.
73. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011;44(1):47-52.
74. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152(4):714-26.
75. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015;526(7574):519-24.
76. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525-30.
77. Lazarian G, Guièze R, Wu CJ. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):984-93.
78. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):4473-9.
79. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(2):521-9.
80. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2014;28(1):108-17.
81. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014;123(21):3247-54.
82. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(2):329-36.
83. Schuh A, Becq J, Humphray S, Alexa A, Burns A, Clifford R, et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*. 2012;120(20):4191-6.
84. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208(7):1389-401.
85. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(12):2854-62.
86. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904-8.
87. Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1403-12.
88. Messina M, Del Giudice I, Khiabani H, Rossi D, Chiaretti S, Rasi S, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia chemo-refractoriness. *Blood*. 2014;123(15):2378-88.

Dr Julien BROSEUS

89. Guièze R, Robbe P, Clifford R, de Guibert S, Pereira B, Timbs A, et al. Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood*. 2015;126(18):2110-7.
90. Ljungström V, Cortese D, Young E, Pandzic T, Mansouri L, Plevova K, et al. Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: clinical impact of recurrent RPS15 mutations. *Blood*. 2016;127(8):1007-16.
91. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(7):1458-61.
92. Jethwa A, Hüllein J, Stolz T, Blume C, Sellner L, Jauch A, et al. Targeted resequencing for analysis of clonal composition of recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2013;163(4):496-500.
93. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Famà R, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(14):2139-47.
94. Sutton LA, Ljungström V, Mansouri L, Young E, Cortese D, Navrkalova V, et al. Targeted next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: a high-throughput yet tailored approach will facilitate implementation in a clinical setting. *Haematologica*. 2015;100(3):370-6.
95. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016;127(17):2122-30.
96. Rasi S, Khiabani H, Ciardullo C, Terzi-di-Bergamo L, Monti S, Spina V, et al. Clinical impact of small subclones harboring NOTCH1, SF3B1 or BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4):e135-8.
97. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(4):877-85.
98. Winkelmann N, Rose-Zerilli M, Forster J, Parry M, Parker A, Gardiner A, et al. Low frequency mutations independently predict poor treatment-free survival in early stage chronic lymphocytic leukemia and monoclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica*. 2015;100(6):e237-9.
99. Jansen RC, Nap JP. Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends Genet*. 2001;17(7):388-91.
100. Monks SA, Leonardson A, Zhu H, Cundiff P, Pietrusiak P, Edwards S, et al. Genetic inheritance of gene expression in human cell lines. *Am J Hum Genet*. 2004;75(6):1094-105.
101. Morley M, Molony CM, Weber TM, Devlin JL, Ewens KG, Spielman RS, et al. Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature*. 2004;430(7001):743-7.
102. Li J, Burmeister M. Genetical genomics: combining genetics with gene expression analysis. *Hum Mol Genet*. 2005;14 Spec No. 2:R163-9.
103. Müller-Hermelink H, Montserrat E, Catovsky D, Campo E, Harris N, Stein H. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In: Swerdlow S, Campo E, Lee Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th edn. Lyon, France: IARC; 2008. p. 180-2.
104. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8(10):1640-5.
105. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007;109(1):259-70.

Dr Julien BROSEUS

106. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497-506.
107. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164-74.
108. Eichhorst B, Fink AM, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):928-42.
109. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016;127(2):208-15.
110. Guièze R, Wu CJ. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126(4):445-53.
111. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(16):4313-20.
112. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol*. 2013;34(12):592-601.
113. Maffei R, Fiorcari S, Martinelli S, Potenza L, Luppi M, Marasca R. Targeting neoplastic B cells and harnessing microenvironment: the "double face" of ibrutinib and idelalisib. *J Hematol Oncol*. 2015;8:60.
114. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(11):997-1007.
115. Robak T, Stilgenbauer S, Tedeschi A. Front-line treatment of CLL in the era of novel agents. *Cancer Treat Rev*. 2017;53:70-8.
116. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*. 2013;19(2):202-8.
117. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(4):311-22.
118. Huber H, Edenhofer S, Estenfelder S, Stilgenbauer S. Profile of venetoclax and its potential in the context of treatment of relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Onco Targets Ther*. 2017;10:645-56.
119. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):768-78.
120. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014;370(24):2286-94.
121. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012;44(11):1236-42.
122. Ferreira PG, Jares P, Rico D, Gómez-López G, Martínez-Trillos A, Villamor N, et al. Transcriptome characterization by RNA sequencing identifies a major molecular and clinical subdivision in chronic lymphocytic leukemia. *Genome Res*. 2014;24(2):212-26.
123. Queirós AC, Villamor N, Clot G, Martínez-Trillos A, Kulis M, Navarro A, et al. A B-cell epigenetic signature defines three biologic subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact. *Leukemia*. 2015;29(3):598-605.

Dr Julien BROSEUS

124. Oakes CC, Claus R, Gu L, Assenov Y, Hüllein J, Zucknick M, et al. Evolution of DNA methylation is linked to genetic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Discov.* 2014;4(3):348-61.
125. Oakes CC, Seifert M, Assenov Y, Gu L, Przekopowicz M, Ruppert AS, et al. DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2016;48(3):253-64.
126. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer.* 2005;103(2):216-28.
127. Tsimberidou AM, O'Brien S, Khouri I, Giles FJ, Kantarjian HM, Champlin R, et al. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2006;24(15):2343-51.
128. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol.* 2008;142(2):202-15.
129. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, Rasi S, Laurenti L, Stamatopoulos K, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood.* 2011;117(12):3391-401.
130. Rossi D, Spina V, Forconi F, Capello D, Fangazio M, Rasi S, et al. Molecular history of Richter syndrome: origin from a cell already present at the time of chronic lymphocytic leukemia diagnosis. *Int J Cancer.* 2012;130(12):3006-10.
131. Parikh SA, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Habermann TM, Ding W, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *Br J Haematol.* 2013;162(6):774-82.
132. Beekman R, Chapaprieta V, Russiñol N, Vilarrasa-Blasi R, Verdager-Dot N, Martens JHA, et al. The reference epigenome and regulatory chromatin landscape of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.* 2018;24(6):868-80.
133. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):251-62.
134. Parikh SA, Kay NE, Shanafelt TD. How we treat Richter syndrome. *Blood.* 2014;123(11):1647-57.
135. Jamroziak K, Tadmor T, Robak T, Polliack A. Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia: updates on biology, clinical features and therapy. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(7):1949-58.
136. Aydin S, Rossi D, Bergui L, D'Arena G, Ferrero E, Bonello L, et al. CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome? *Blood.* 2008;111(12):5646-53.
137. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res.* 2009;15(13):4415-22.
138. Rossi D, Lobetti Bodoni C, Genuardi E, Monitillo L, Drandi D, Cerri M, et al. Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2009;23(6):1062-72.
139. Fangazio M, De Paoli L, Rossi D, Gaidano G. Predictive markers and driving factors behind Richter syndrome development. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011;11(3):433-42.
140. Rossi D, Rasi S, Spina V, Fangazio M, Monti S, Greco M, et al. Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol.* 2012;158(3):426-9.
141. Parikh SA, Shanafelt TD. Risk factors for Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2014;9(3):294-9.

Dr Julien BROSEÚS

142. Solh M, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Appelbaum FR, Tallman MS, et al. The impact of initial fludarabine therapy on transformation to Richter syndrome or prolymphocytic leukemia in patients with chronic lymphocytic leukemia: analysis of an intergroup trial (CALGB 9011). *Leuk Lymphoma*. 2013;54(2):252-4.
143. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer M, Bezares RF, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370(9583):230-9.
144. Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I, Rossi D, Rancoita PM, Strefford JC, et al. Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood*. 2013;122(15):2673-82.
145. Rossi D. XIII. Molecular pathogenesis of transformed lymphomas. *Hematol Oncol*. 2015;33 Suppl 1:70-4.
146. Langerbeins P, Busch R, Anheier N, Dürig J, Bergmann M, Goebeler ME, et al. Poor efficacy and tolerability of R-CHOP in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia and Richter transformation. *Am J Hematol*. 2014;89(12):E239-43.
147. Tsimberidou AM, Wierda WG, Plunkett W, Kurzrock R, O'Brien S, Wen S, et al. Phase I-II study of oxaliplatin, fludarabine, cytarabine, and rituximab combination therapy in patients with Richter's syndrome or fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2008;26(2):196-203.
148. Tsimberidou AM, Wierda WG, Wen S, Plunkett W, O'Brien S, Kipps TJ, et al. Phase I-II clinical trial of oxaliplatin, fludarabine, cytarabine, and rituximab therapy in aggressive relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia or Richter syndrome. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13(5):568-74.
149. Cwynarski K, van Biezen A, de Wreede L, Stilgenbauer S, Bunjes D, Metzner B, et al. Autologous and allogeneic stem-cell transplantation for transformed chronic lymphocytic leukemia (Richter's syndrome): A retrospective analysis from the chronic lymphocytic leukemia subcommittee of the chronic leukemia working party and lymphoma working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol*. 2012;30(18):2211-7.
150. Tsang M, Shanafelt TD, Call TG, Ding W, Chanan-Khan A, Leis JF, et al. The efficacy of ibrutinib in the treatment of Richter syndrome. *Blood*. 2015;125(10):1676-8.
151. Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C, Rancoita PM, Chigrinova E, Mian M, et al. Genomic profiling of Richter's syndrome: recurrent lesions and differences with de novo diffuse large B-cell lymphomas. *Hematol Oncol*. 2010;28(2):62-7.
152. Fabbri G, Khiabanian H, Holmes AB, Wang J, Messina M, Mullighan CG, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med*. 2013;210(11):2273-88.
153. Rinaldi A, Mensah AA, Kwee I, Forconi F, Orlandi EM, Lucioni M, et al. Promoter methylation patterns in Richter syndrome affect stem-cell maintenance and cell cycle regulation and differ from de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2013;163(2):194-204.
154. Kulis M, Merkel A, Heath S, Queirós AC, Schuyler RP, Castellano G, et al. Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nat Genet*. 2015;47(7):746-56.
155. Kretzmer H, Bernhart SH, Wang W, Haake A, Weniger MA, Bergmann AK, et al. DNA methylome analysis in Burkitt and follicular lymphomas identifies differentially methylated regions linked to somatic mutation and transcriptional control. *Nat Genet*. 2015;47(11):1316-25.
156. Queirós AC, Beekman R, Vilarrasa-Blasi R, Duran-Ferrer M, Clot G, Merkel A, et al. Decoding the DNA Methylome of Mantle Cell Lymphoma in the Light of the Entire B Cell Lineage. *Cancer Cell*. 2016;30(5):806-21.
157. Chen G, Broséus J, Hergalant S, Donnart A, Chevalier C, Bolaños-Jiménez F, et al. Identification of master genes involved in liver key functions through transcriptomics and epigenomics of methyl donor deficiency in rat: relevance to nonalcoholic liver disease. *Mol Nutr Food Res*. 2015;59(2):293-302.

Dr Julien BROSEUS

158. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
159. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(4):235-42.
160. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4117-26.
161. Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Savitski MM, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*. 2014;509(7502):582-7.
162. Gholami AM, Hahne H, Wu Z, Auer FJ, Meng C, Wilhelm M, et al. Global proteome analysis of the NCI-60 cell line panel. *Cell Rep*. 2013;4(3):609-20.
163. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):227-32.
164. Perrot A, Pionneau C, Nadaud S, Davi F, Leblond V, Jacob F, et al. A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(4):e1-15.
165. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579-86.
166. Bohers E, Viailly PJ, Dubois S, Bertrand P, Maingonnat C, Mareschal S, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis. *Haematologica*. 2015;100(7):e280-4.
167. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, Moorhead M, Pepin F, Kong K, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol*. 2015;16(5):541-9.
168. Kurtz DM, Green MR, Bratman SV, Scherer F, Liu CL, Kunder CA, et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood*. 2015;125(24):3679-87.
169. Camus V, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, Dubois S, Mareschal S, Bertrand P, et al. Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2016:1-9.
170. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Dynamic monitoring of circulating tumor DNA in non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2016;127(25):3127-32.
171. Yeh P, Hunter T, Sinha D, Ftouni S, Wallach E, Jiang D, et al. Circulating tumour DNA reflects treatment response and clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun*. 2017;8:14756.
172. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014;20(5):548-54.
173. Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):547-55.
174. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AF, Esfahani MS, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 2016;8(364):364ra155.
175. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, Monti S, Zanni M, Rasi S, et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood*. 2017;129(14):1947-57.
176. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(1):32-42.

Dr Julien BROSEUS

177. Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, Lehman A, Blachly JS, Lozanski A, et al. BTK. *J Clin Oncol*. 2017;35(13):1437-43.
178. Anderson MA, Tam C, Lew TE, Juneja S, Juneja M, Westerman D, et al. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*. 2017;129(25):3362-70.
179. Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science*. 2008;321(5891):974-7.
180. Topp MS, Kufer P, Gökbuget N, Goebeler M, Klinger M, Neumann S, et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol*. 2011;29(18):2493-8.
181. Topp MS, Gökbuget N, Zugmaier G, Klappers P, Stelljes M, Neumann S, et al. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2014;32(36):4134-40.
182. Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376(9):836-47.
183. Martinelli G, Boissel N, Chevallier P, Ottmann O, Gökbuget N, Topp MS, et al. Complete Hematologic and Molecular Response in Adult Patients With Relapsed/Refractory Philadelphia Chromosome-Positive B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Following Treatment With Blinatumomab: Results From a Phase II, Single-Arm, Multicenter Study. *J Clin Oncol*. 2017;35(16):1795-802.
184. Viardot A, Goebeler ME, Hess G, Neumann S, Pfreundschuh M, Adrian N, et al. Phase 2 study of the bispecific T-cell engager (BiTE) antibody blinatumomab in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2016;127(11):1410-6.
185. Ding W, LaPlant BR, Call TG, Parikh SA, Leis JF, He R, et al. Pembrolizumab in patients with CLL and Richter transformation or with relapsed CLL. *Blood*. 2017;129(26):3419-27.
186. Xu-Monette ZY, Zhou J, Young KH. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood*. 2018;131(1):68-83.
187. Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, Boveri E, Pellagatti A, Gallì A, et al. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood*. 2009;114(17):3538-45.
188. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2006;108(6):1865-7.
189. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270.
190. Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2010;363(12):1189-90.
191. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;116(6):988-92.
192. Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H, Dunbar A, Tiu R, Huh J, et al. Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6109-16.
193. Suessmuth Y, Elliott J, Percy MJ, Inami M, Attal H, Harrison CN, et al. A new polycythaemia vera-associated SOCS3 SH2 mutant (SOCS3F136L) cannot regulate erythropoietin responses. *Br J Haematol*. 2009;147(4):450-8.

Dr Julien BROSEUS

194. Wang J, Kong G, Liu Y, Du J, Chang YI, Tey SR, et al. Nras(G12D/+) promotes leukemogenesis by aberrantly regulating hematopoietic stem cell functions. *Blood*. 2013;121(26):5203-7.
195. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccia N, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(8):743-55.
196. Kratz CP, Niemeyer CM, Castleberry RP, Cetin M, Bergsträsser E, Emanuel PD, et al. The mutational spectrum of PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome/myeloproliferative disease. *Blood*. 2005;106(6):2183-5.
197. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009;23(5):905-11.
198. Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, Paschka P, Griesshammer M, Blersch C, et al. DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011;25(7):1217-9.
199. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*. 2011;118(19):5227-34.
200. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496-506.
201. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-65.
202. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2011;25(7):1147-52.
203. Nazha A, Narkhede M, Radivoyevitch T, Seastone DJ, Patel BJ, Gerds AT, et al. Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2016;30(11):2214-20.
204. Fenaux P, Ades L, Fontenay M, Raynaud S, Eclache V, Rose C, et al. French consensus on myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia: diagnostic, classification and treatment 2015 update by the Myelodysplasia French Group. *Hématologie*. 2015;21(1):28-45.
205. Guerci-Bresler A, Ades L, Gyan E, Mohty M, Legros L, Isnard F, et al. Recommandations pour l'utilisation de l'Azacitidine dans le traitement des syndromes myélodysplasiques de risque intermédiaire-2 ou élevé. *Fiches pratiques du Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM)*. 2010;1 (janvier février mars)(1):1-8.
206. Fandy TE, Herman JG, Kerns P, Jiemjit A, Sugar EA, Choi SH, et al. Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(13):2764-73.
207. Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(3):497-506.
208. Cedena MT, Rapado I, Santos-Lozano A, Ayala R, Onecha E, Abaigar M, et al. Mutations in the DNA methylation pathway and number of driver mutations predict response to azacitidine in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2017;8(63):106948-61.
209. Wang H, Li Y, Lv N, Wang L, Yu L. Predictors of clinical responses to hypomethylating agents in acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2018;97(11):2025-38.
210. Tobiasson M, Abdulkadir H, Lennartsson A, Katayama S, Marabita F, De Paepe A, et al. Comprehensive mapping of the effects of azacitidine on DNA methylation, repressive/permissive histone marks and gene expression in primary cells from patients with MDS and MDS-related disease. *Oncotarget*. 2017;8(17):28812-25.

Dr Julien BROSEUS

211. Maegawa S, Gough SM, Watanabe-Okochi N, Lu Y, Zhang N, Castoro RJ, et al. Age-related epigenetic drift in the pathogenesis of MDS and AML. *Genome Res.* 2014;24(4):580-91.
212. Li S, Garrett-Bakelman FE, Chung SS, Sanders MA, Hricik T, Rapaport F, et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Nat Med.* 2016;22(7):792-9.