

Hématopoïèse des histiocytoses sévères pédiatriques

Centre de recherche Saint Antoine UMRS 938

Equipe « Hematopoietic and Leukemic development » Pr François Delhommeau

Directeur du travail, Dr Sebastien Heritier, MCU-PH, Hôpital Armand Trousseau, Paris



17 septembre 2021
Solenne Le Louët, Interne DES pédiatrie

Introduction – Histiocytose langerhansienne (HL)

- Néoplasie myéloïde inflammatoire



- **HL OR+** : Présentation disséminée avec atteinte **organes à risques (OR)** : foie, rate, hémato
Toutes mutées *BRAF*^{V600E}

TTT: 50% des HL OR+ sont chimiorésistantes

=> inhibiteurs de BRAF

Réponse clinique complète constante, mais récidive à l'arrêt du traitement

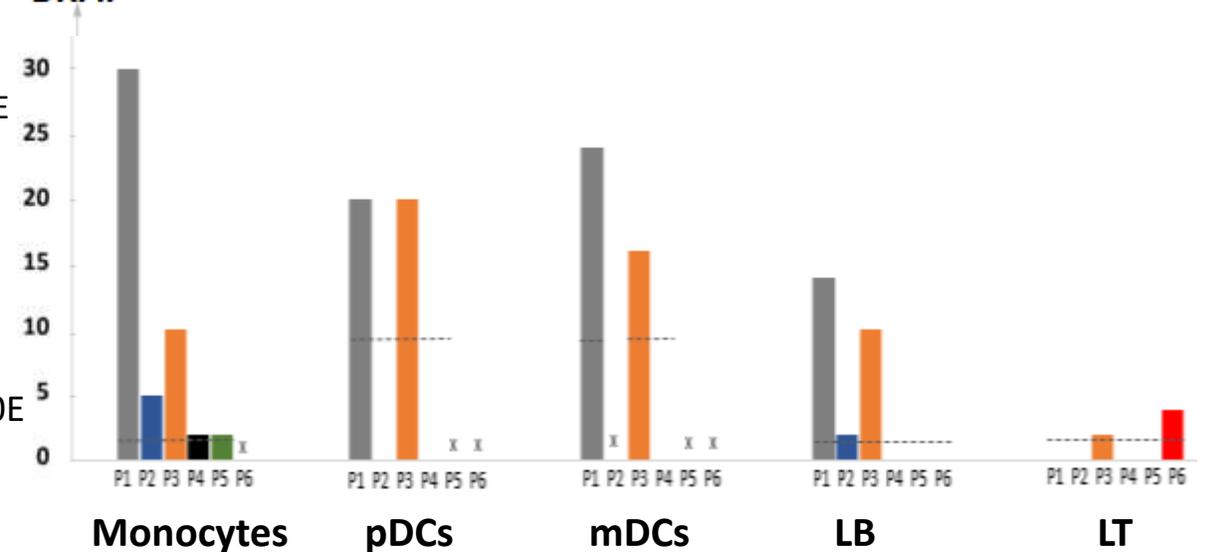
BRAF^{V600E} libre circulant : **Marqueur moléculaire** de la maladie

Persistance de l'allèle *BRAF*^{V600E} dans l'ADN libre circulant sous thérapie ciblée

Introduction – Origine cellulaire de la maladie

- Biopsie lésion : Histiocytes pathologiques CD1a+CD207+ mutés *BRAF*^{V600E}
- Cellules sanguines :
 - n=6 patients étudiés
 - Sous-populations triées positives pour *BRAF*^{V600E}
- Compartiment médullaire ?
 - n=6 cas publiés avec identification de *BRAF*^{V600E}
 - % de cellules médullaires mutées : 0,02% - 8%

% cellules mutées
BRAF^{V600E}



Hypothèses et objectifs

Hypothèses :

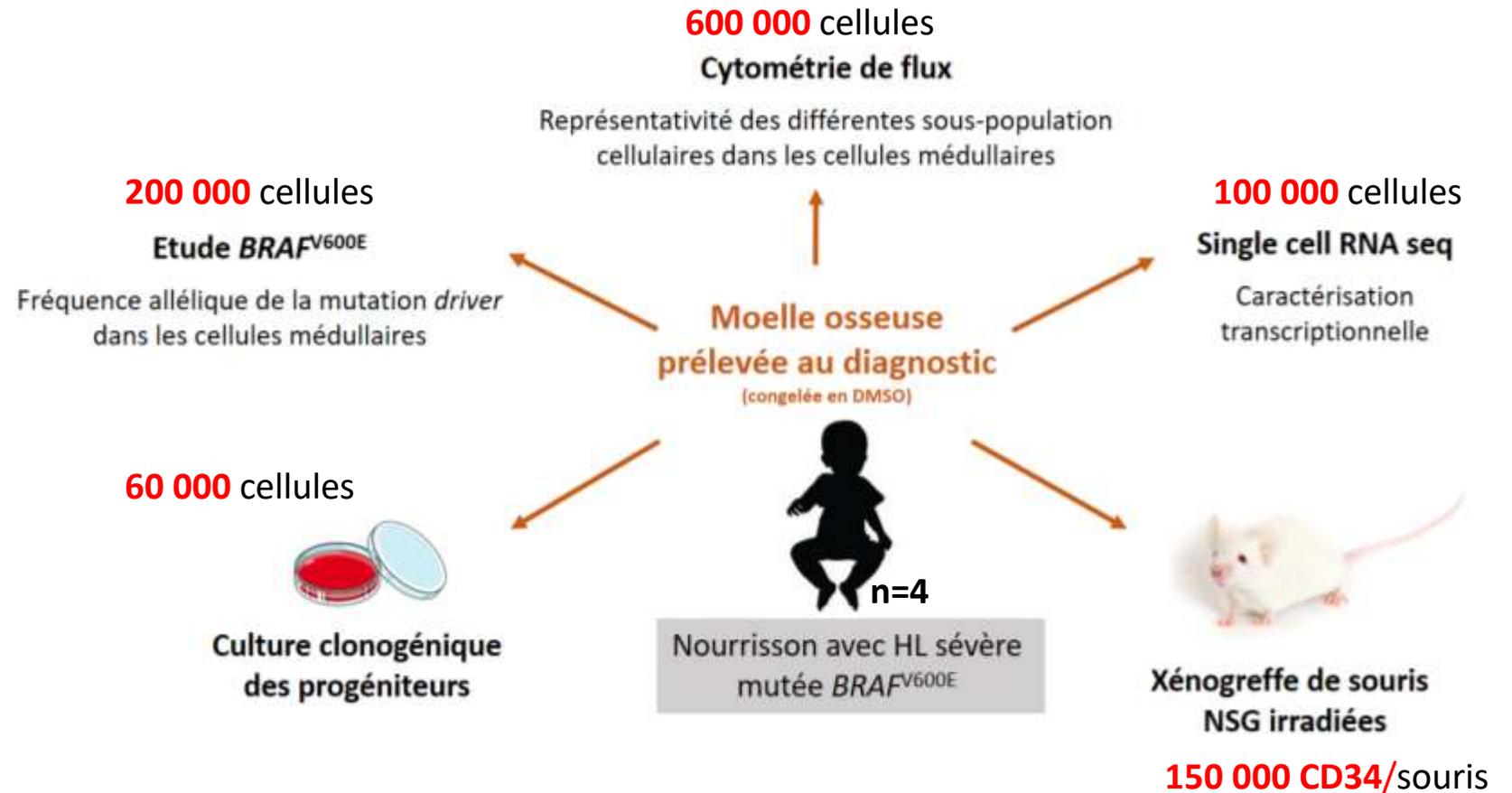
- Initiation de la maladie au niveau médullaire: cellules progénitrices ou CSHs
- Stade de l'hématopoïèse d'acquisition de la mutation $BRAF^{V600E}$ pourrait être corrélé à la sévérité de la maladie et à la sensibilité aux traitements

Objectifs :

- Etudier les cellules **médullaires** d'enfants atteints d'HL OR+
- **Tester** un modèle de xénogreffe

Matériels et méthodes

	Nombres de cellules médullaires congelées
P1	42 M
P2	38 M
P3	40 M
P4	10 M



Résultats – Moléculaire et phénotypique

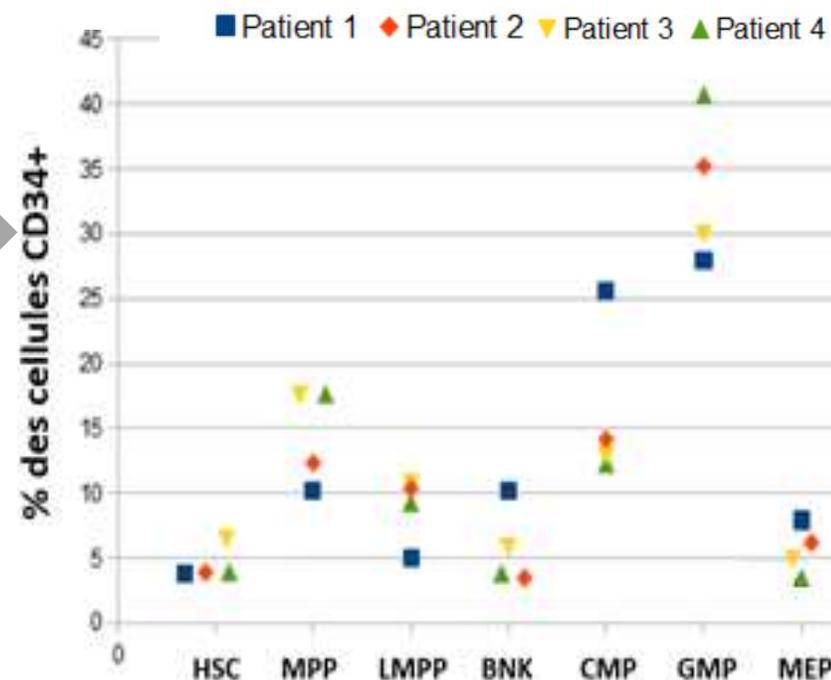
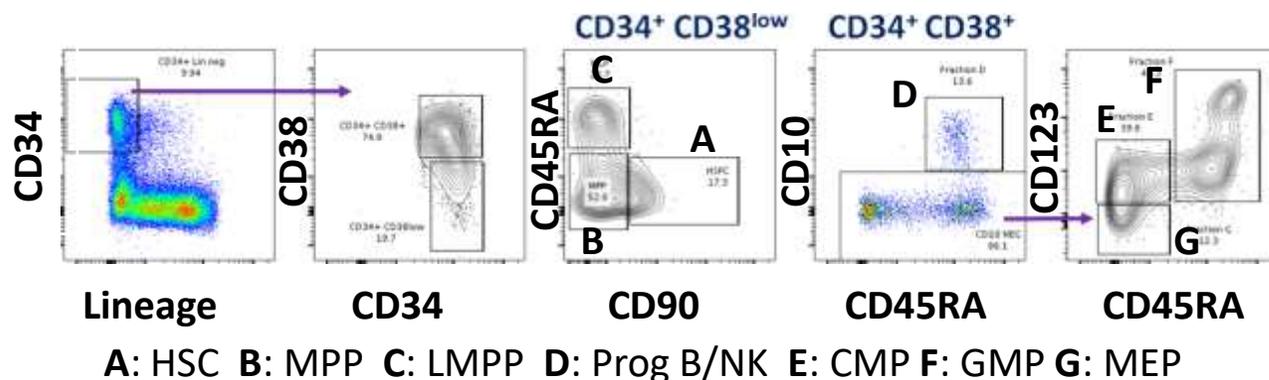
- % mutation ***BRAF*^{V600E}**

PCR digitale QIAcuity
(sensibilité 0,1%)

	Échantillons médullaires décongelés		
	Partitions <i>BRAF</i> ^{V600E}	Partitions <i>BRAF</i> WT	Fréquence allélique <i>BRAF</i> ^{V600E}
P1	99	2397	4 %
P2	8	2206	0,4 %
P3	0	2259	0 %
P4	4	3460	0,1%

- **CMF**

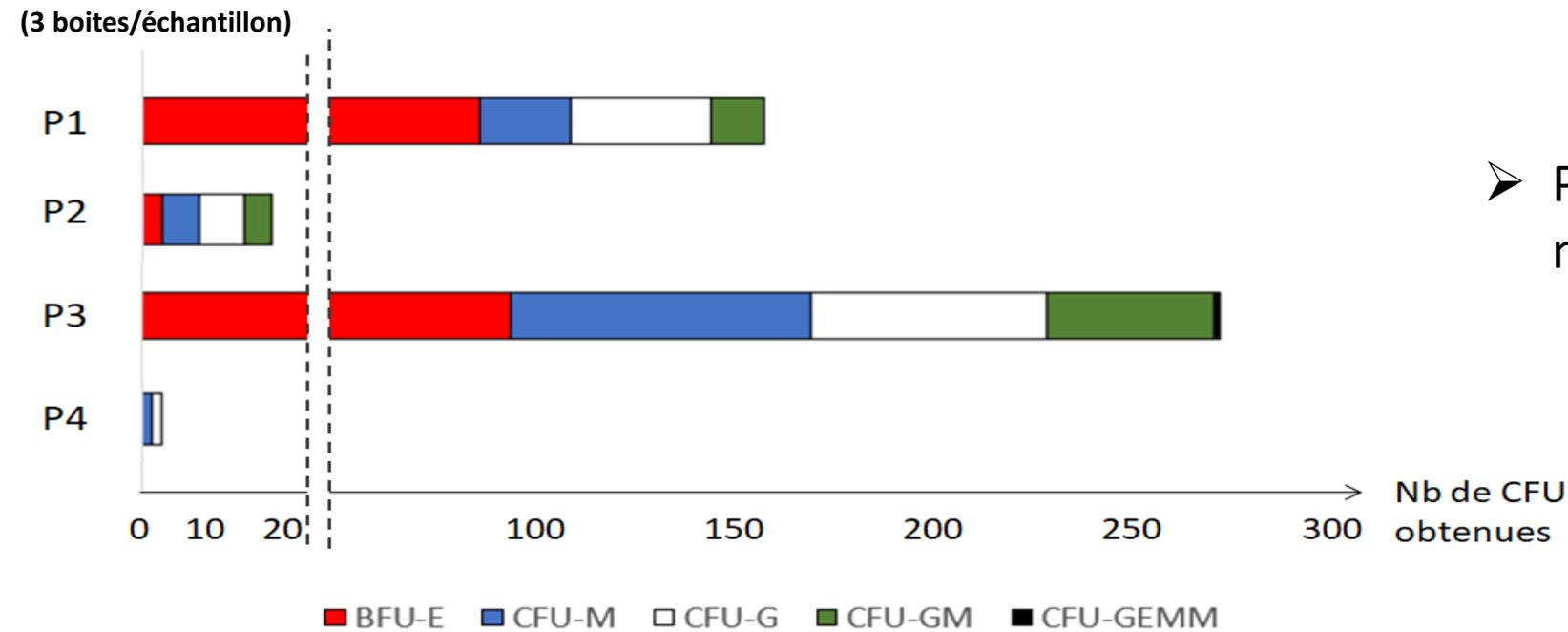
	% CD34
P1	5
P2	2,4
P3	7
P4	2,7



➤ % CD34+ entre 2,4 et 7%

➤ Progéniteurs myéloïdes (CMP et GMP) en proportion plus importantes

Résultats – Culture méthylcellulose

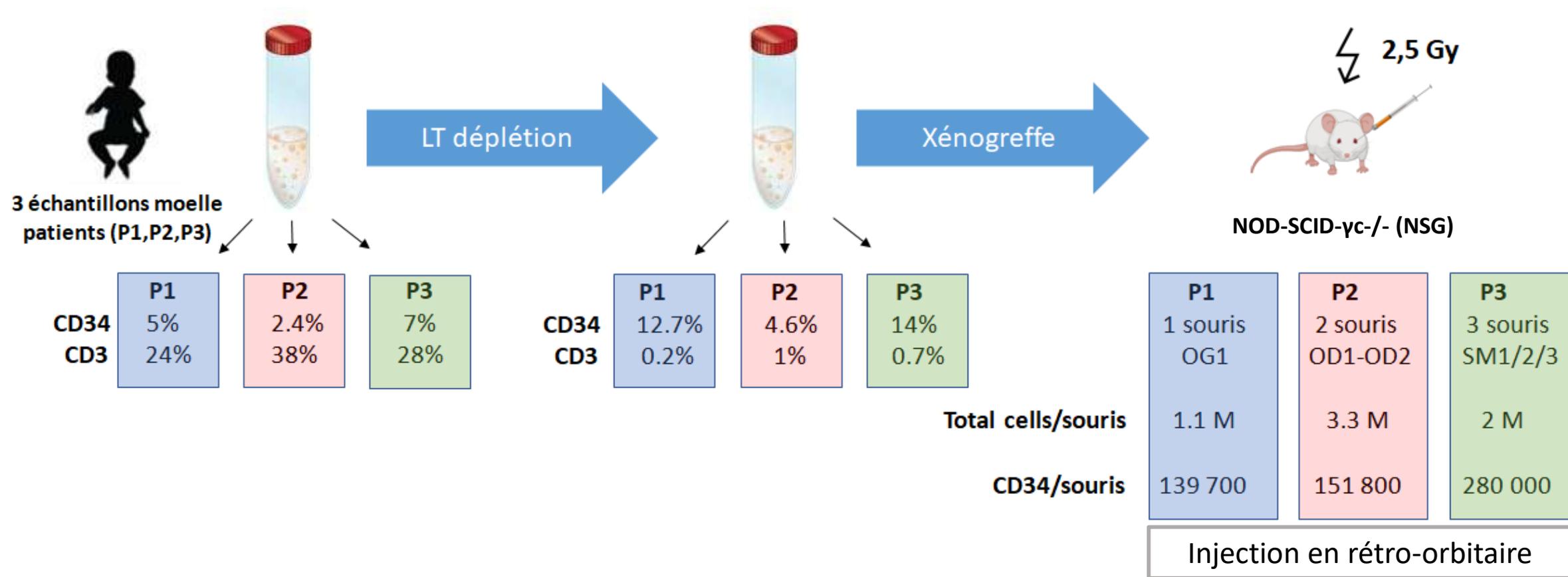


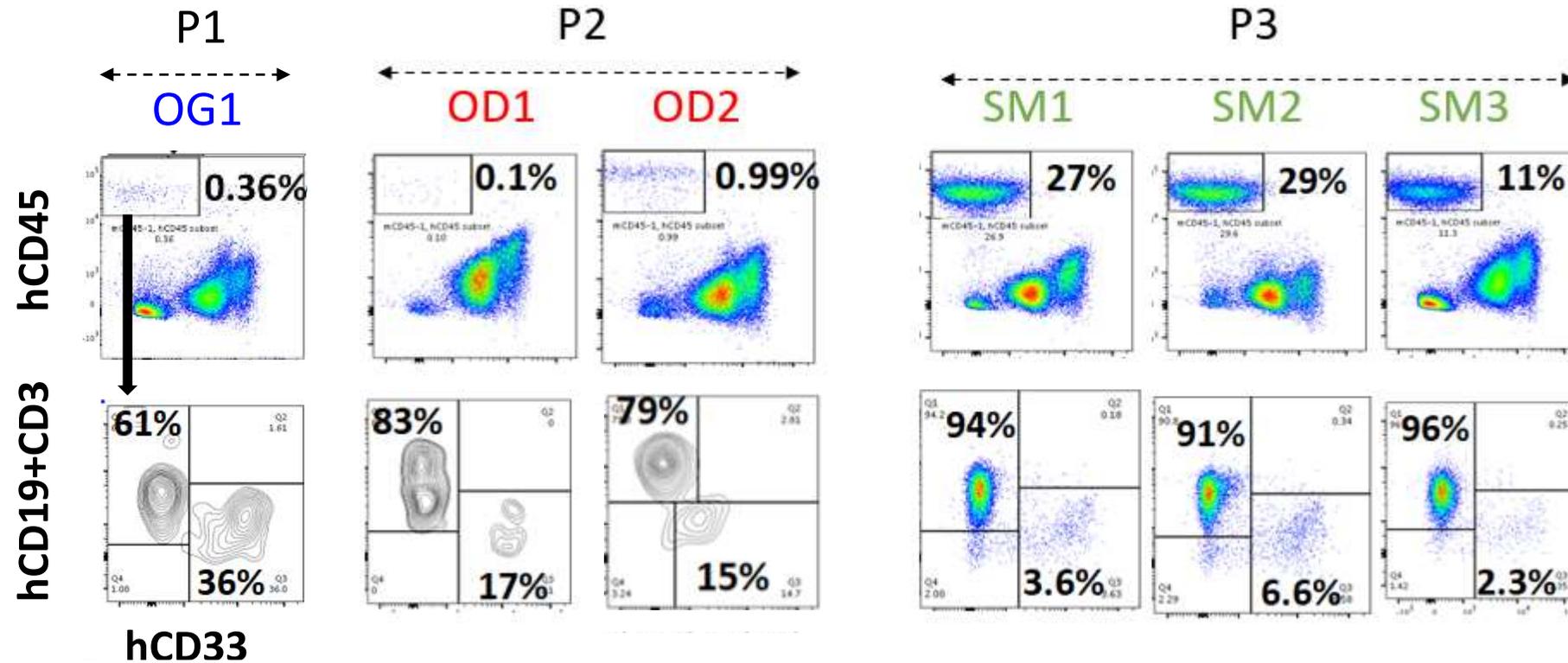
➤ P1 et P3 => Prolifération et propriétés multilignages

	% mutation <i>BRAF</i> ^{V600E}	
	ADN extrait des cellules médullaires décongelées	ADN extrait des cellules issues des cultures méthylcellulose à J14
P1	4 %	0,7%
P3	0 %	0 %

➤ Mutation présente après la culture

Résultats – Procédure xénogreffe

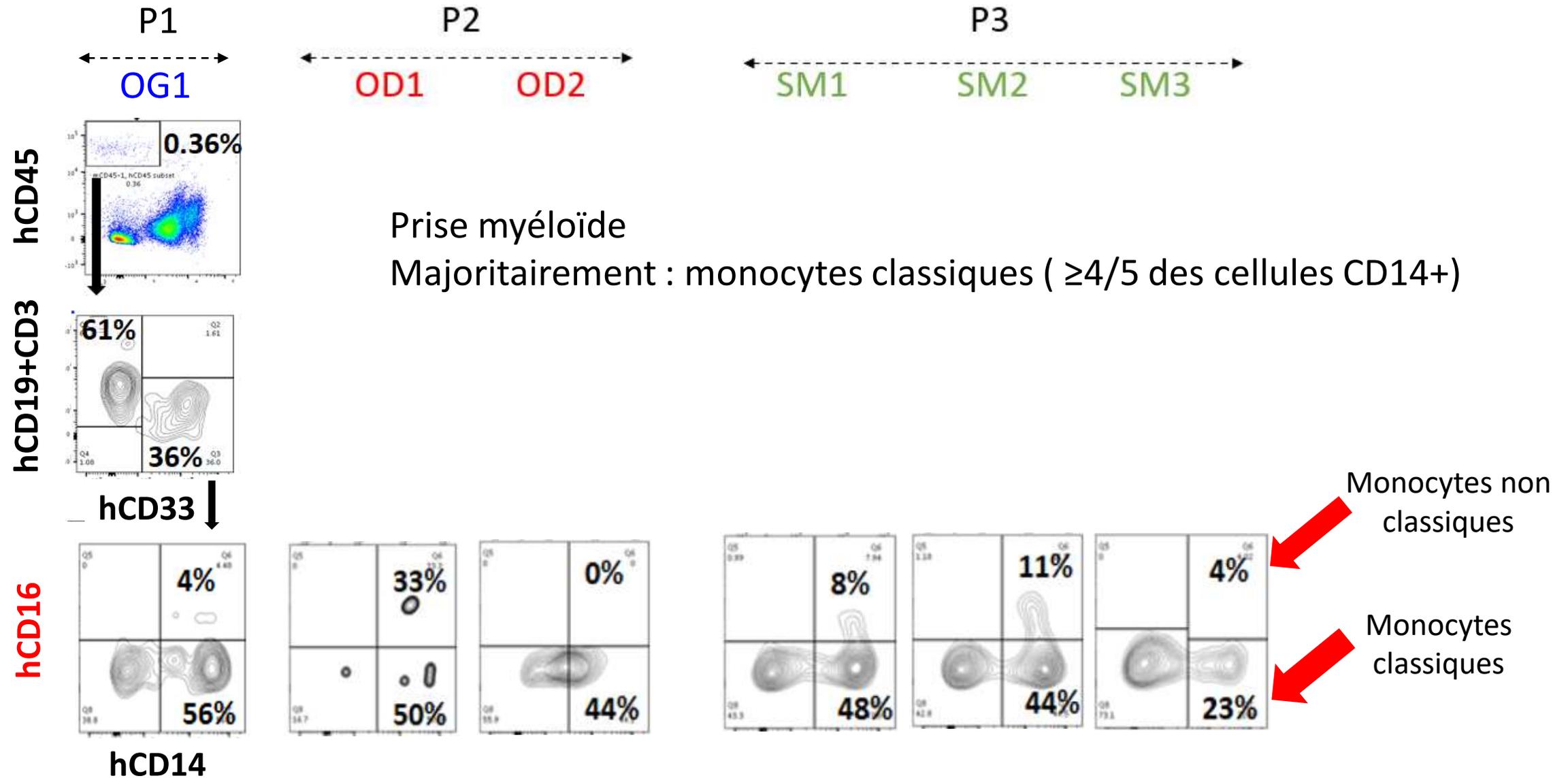




- 2 mois : prise de greffe des 6 souris, majoritairement lymphoïde.
- Lignée myéloïde présente dans toutes les souris.

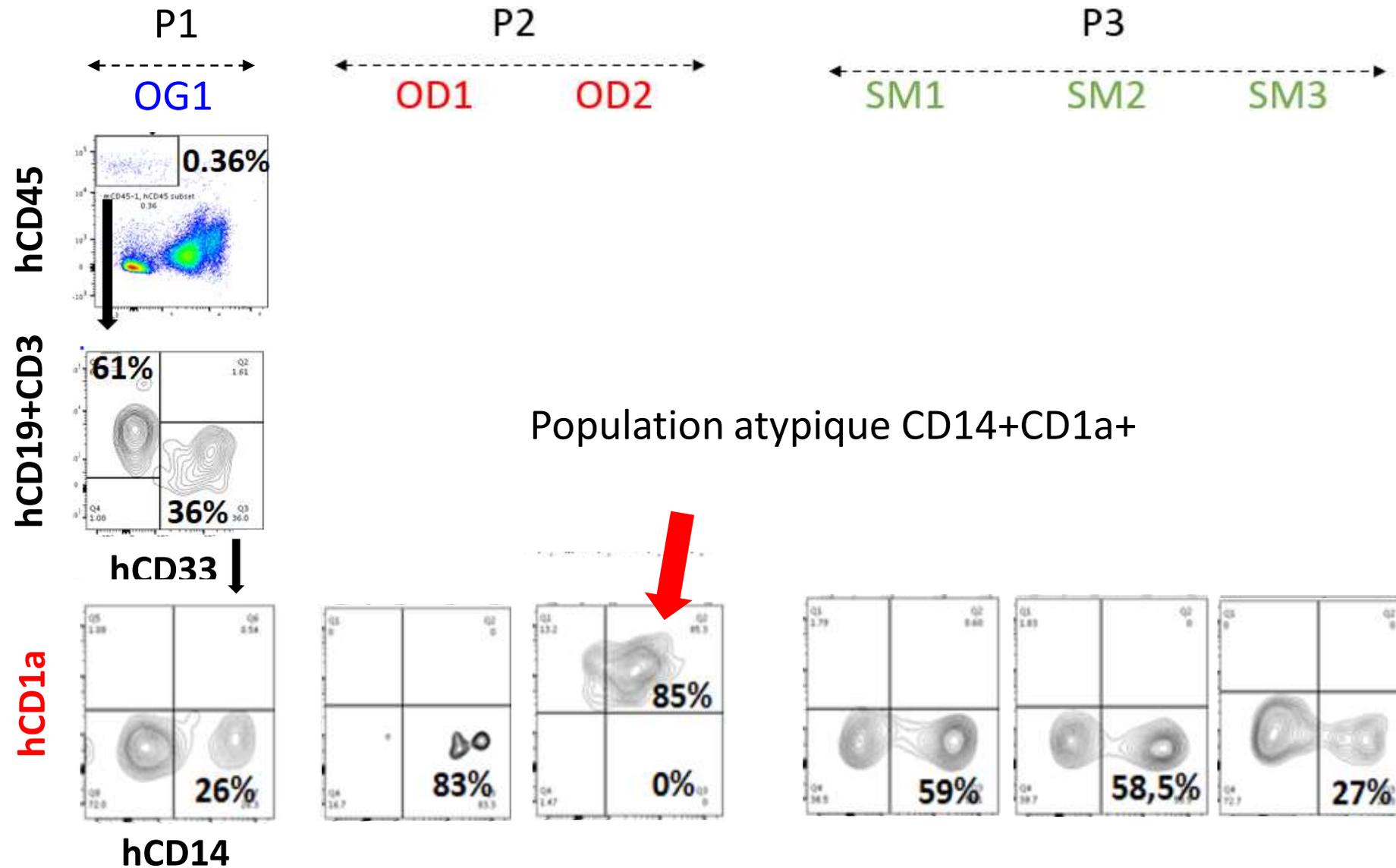
Résultats – Xénogreffe

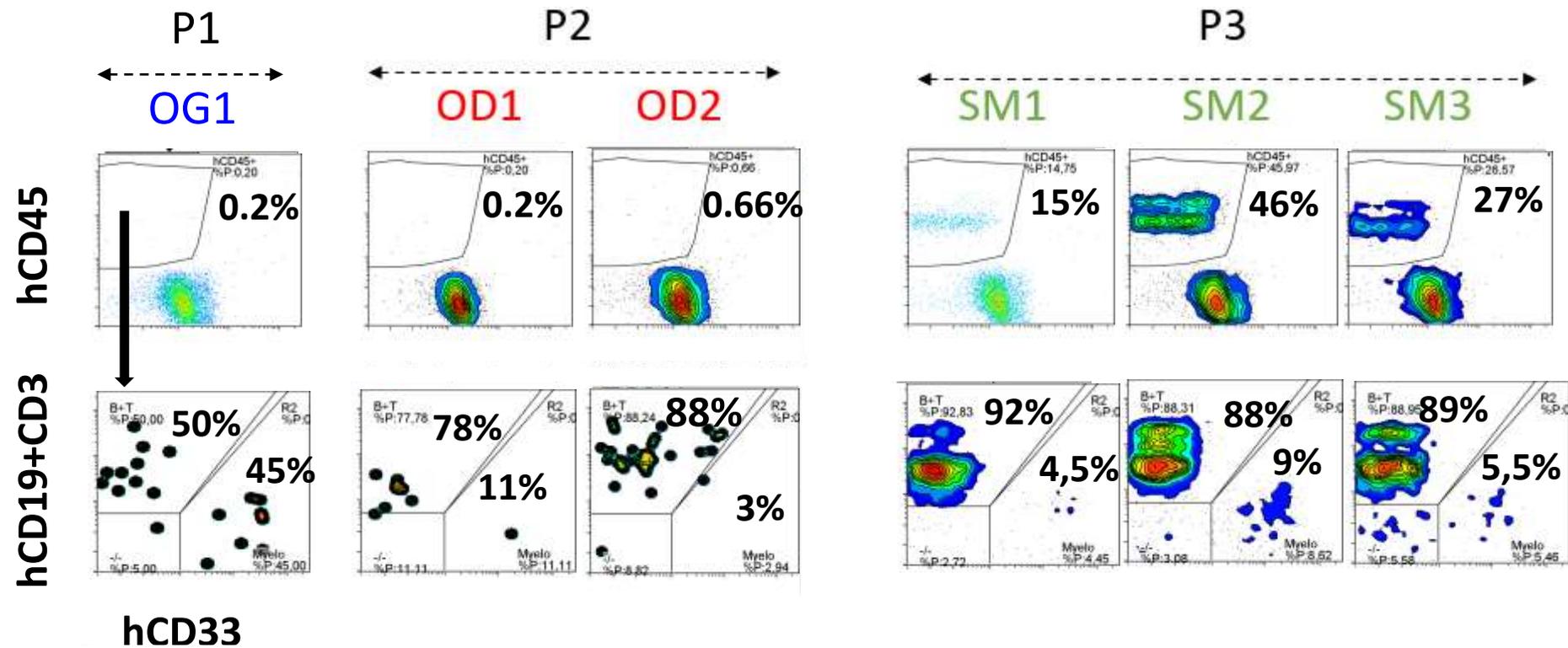
Prélèvement sanguin à 2 mois



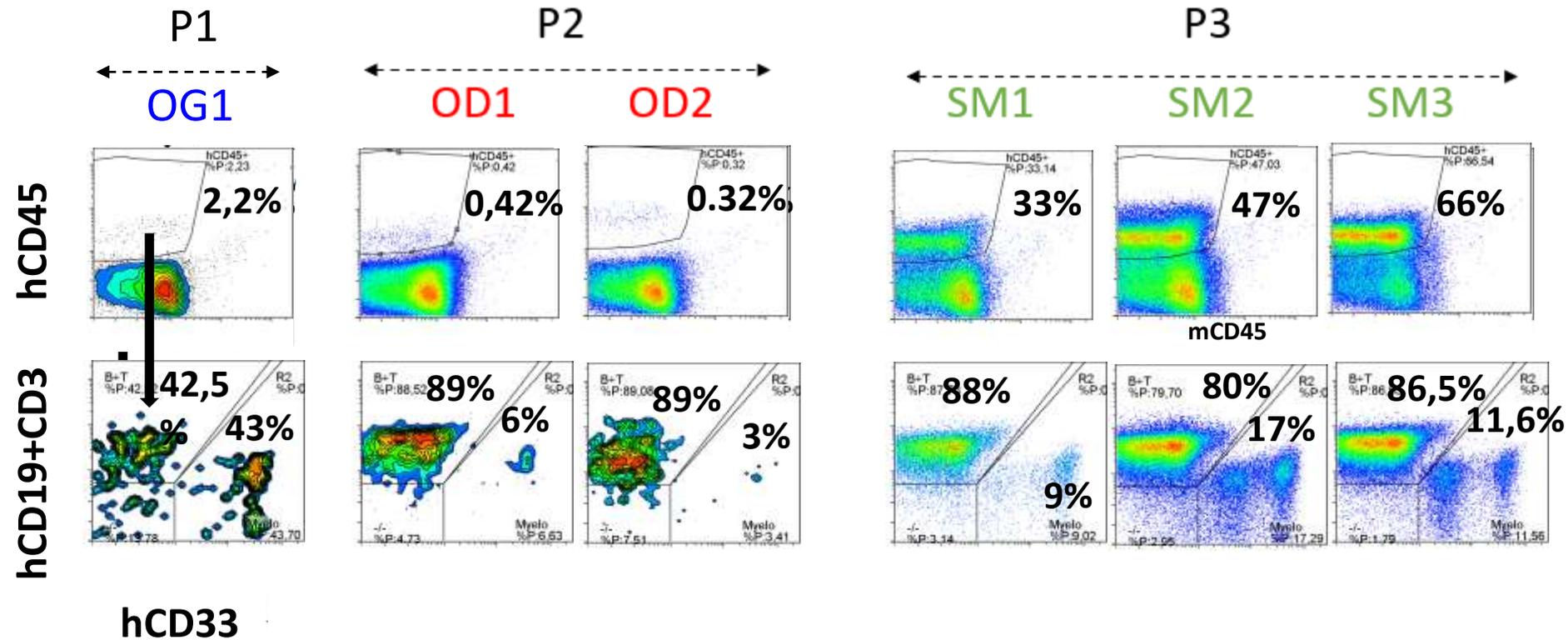
Résultats – Xénogreffe

Prélèvement sanguin à 2 mois





- La prise myéloïde persiste mais est très minoritaire
- OD2 : population atypique non retrouvée à M4



- Bonne prise de greffe seulement pour les souris issues de P3.
- Lignée myéloïde minoritaire
- 1 GVH à 6 mois (SM2) : sacrifiée.

- Sang

	Partitions <i>BRAF</i> ^{V600E}	Partitions BRAF WT	Fréquence allélique <i>BRAF</i> ^{V600E}
OG	0	2	ADN non amplifiable
OD1	0	2	
OD2	0	2	
SM1	0	2006	0 %
SM2	0	2880	0 %
SM3	0	2529	0 %

- Moelle

	Partitions <i>BRAF</i> ^{V600E}	Partitions BRAF WT	Fréquence allélique <i>BRAF</i> ^{V600E}
OG	0	18	ADN non amplifiable
OD1	0	3	
OD2	0	6	
SM1	0	499	0%
SM2	0	972	0%
SM3	0	1232	0%

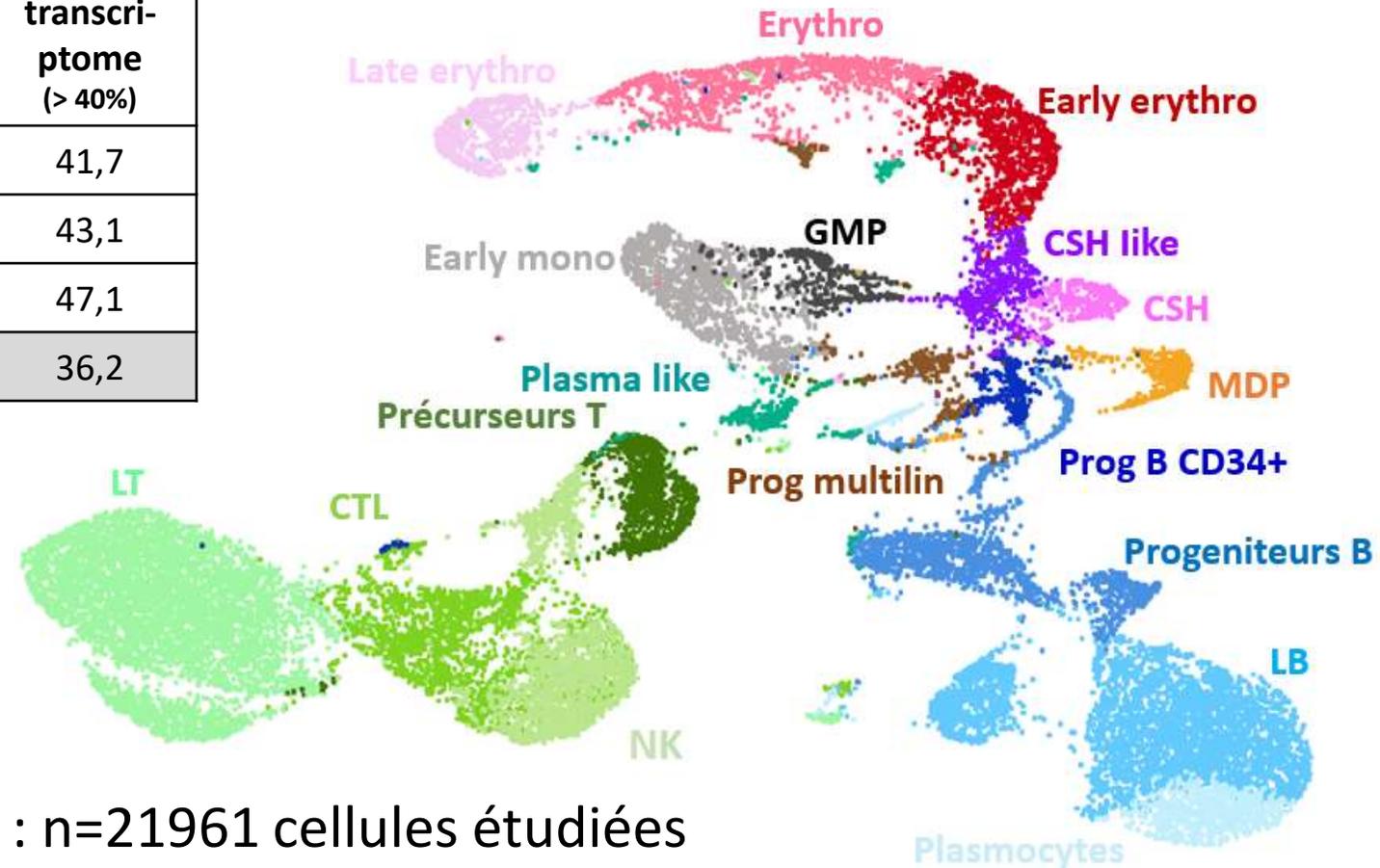
Résultats – scRNAseq 10x (Sequençage en 3')

- **Contrôle qualité**

	% viabilité	Nb cells après tri*	Cells analysées	Nbre gènes/ cell (500-3000)	% barcode valide (90%)	% reads /cell (>80%)	% relié au transcriptome (> 40%)
P1	72 %	21 789	6933	1726	97,7	86	41,7
P2	79 %	25 000	5371	1863	97,6	88	43,1
P3	73 %	30 000	6091	1862	97,7	89	47,1
P4	57 %	18 150	3566	1730	97,7	84	36,2

* Tri uniquement sur marqueur viabilité

- **Analyse des données agrégées**



➤ Analyse préliminaire (**Loupe Browser**) : n=21961 cellules étudiées
26 clusters identifiés

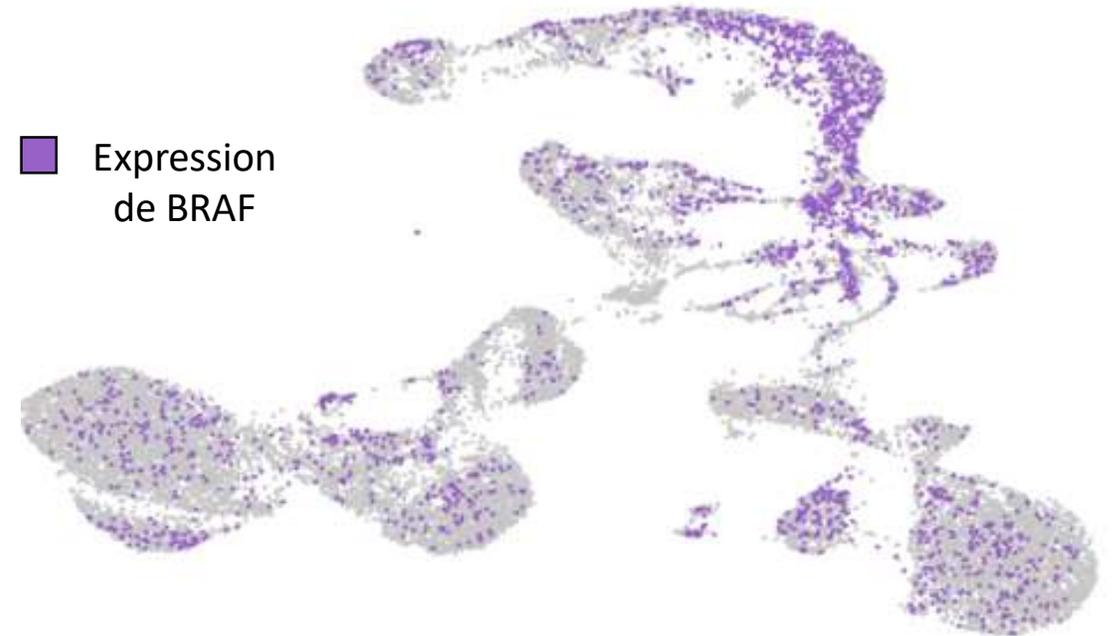
Résultats – scRNAseq (Aggr)

Expression CD1a et CD207+



➤ Pas d'expression des ces 2 transcrits

Expression BRAF



➤ Transcrit BRAF exprimés

- Dans l'ensemble des clusters
- Plus exprimés dans les clusters early-erythro, les progéniteurs et les CSH.

Discussion

- **Faisabilité** de l'analyse par plusieurs approches expérimentales d'échantillons médullaires **rare**
 - Application à de nouveaux échantillons (étude HISTIOtarget 2020-2030)
 - Etude de moelles contrôles (donneurs pédiatriques)
- Observation de l'**impact de la mutation *BRAF*^{V600E}** sur les cellules médullaires :
avantage sélectif ? Sénescence ?
 - Culture en méthylcellulose et évolution des cellules médullaires xénogreffées
 - Etude approfondie scRNA seq

Merci de votre attention

Centre de référence des Histiocytose pédiatriques
Registre national des Histiocytoses

Dr S. Héritier

Dr J. Donadieu



Equipe développement hématopoïétique et leucémique: maladie et thérapie cellulaire

Pr F. Delhommeau

(CRSA, Sorbonne Université)



Laboratoire des cellules Souches Hématopoïétiques et des Leucémies

Dr M-L. Arcangeli

Dr F. Pflumio

(U1274, IRCM Fontenay-aux-Roses)



Anatomie et cytologie pathologiques
Laboratoire

Dr Z. Hélias-Rodzewicz

Pr J.F. Emile (EA 4340, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines)



BACK UP SLIDE

Neuro histiocytose – Etudes préliminaires (ELISA)

- Gavhed, *PBC* 2009 : **Etude du LCR de 9 patients HL ND**

4 échantillons de patients : NFL > 125 ng/l

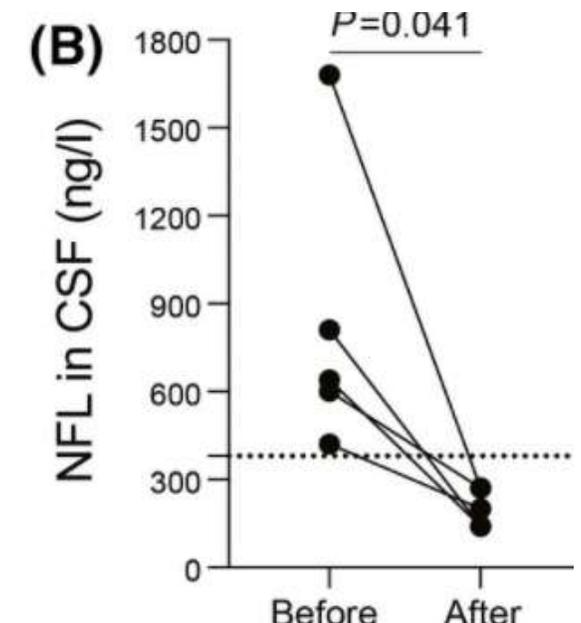
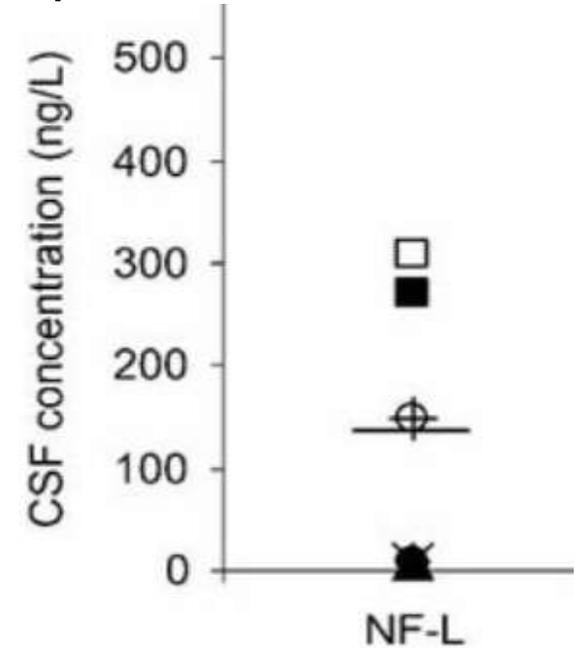
5 échantillons : NFL < seuil de détection (10 ng/L) (3 maladie stables
+ 2 progressives)

110 controles sains (diagnostic LAL) <**125 ng/l**.

- Henter, *BJH* 2021 : **Etude du LCR de 17 patients HL**

5 patients HL ND : NFL >380 ng/l; diminution significative après iMEK

12 patients sans atteinte ND: 11 < 380 ng/l



Neuro histiocytose – Résultat préliminaires

- **LCR (pg/ml)**

11 patients HL ND (87-1127) (9 patients >125; 4 patients >380 pg/ml)

1 patient HL non ND : 62 pg/ml - **Valeur la plus basse**

3 non HL (LAL) :

- 178; 353 pg/ml: **Valeurs limites hautes**

- **2759** pg/ml: Atteinte neurotoxique/ tumorale++

- **9 plasmas concomitants J0+/-7**

(4-12 pg/ml)

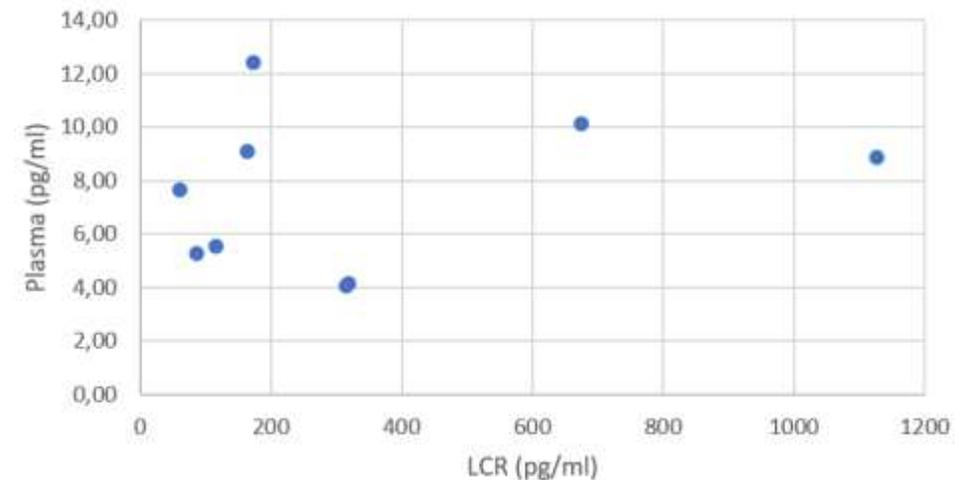
- **Plasma (pg/ml)**

13 HL ND (2,9- 35,8)

10 HL non ND (2,7- 133,8)

3 non HL (3,5-20,6)

Corrélation LCR et plasma



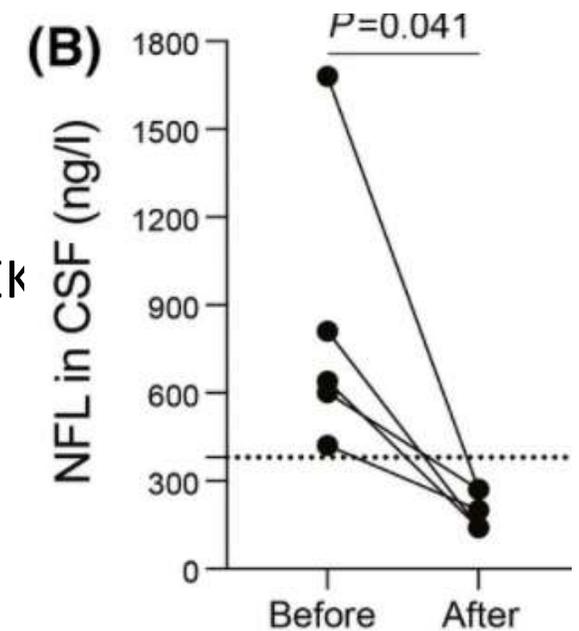
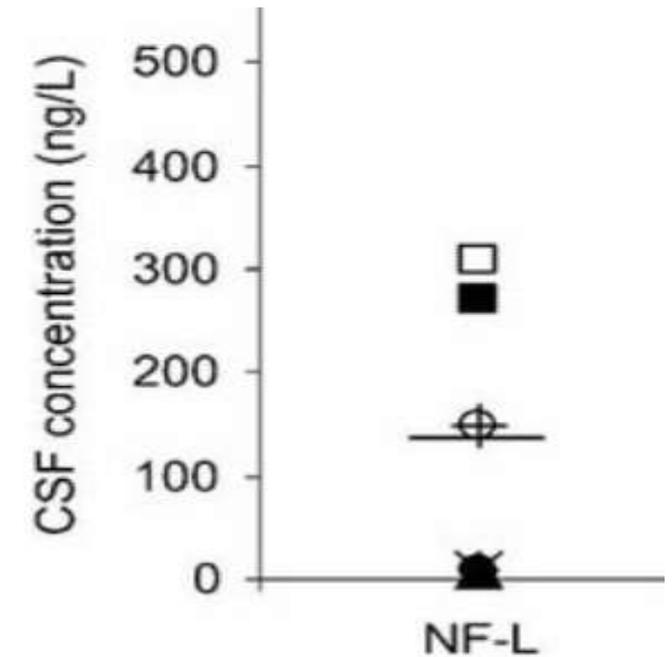
Neuro histiocytose – Etudes préliminaires

- Gavhed, *PBC* 2009: **Etude du LCR de 9 patients HL ND:**
4 échantillons de patients: NFL > 125 ng/ml.
5 échantillons: NFL < seuil de détection (10 ng/L) (3 maladie stable + 2 progressive)
110 contrôles sains (diagnostic LAL) **<125 ng/ml.**

Petits échantillons

Taux de NF-L inférieurs au seuil de détection

- Henter, *BJH* 2021: **Etude du LCR de 17 patients**
5 patients HL ND : NFL >380 ng/ml; diminution significative après iMEK
12 patients sans atteinte ND: 11 < 380 ng/ml



Ostéopontine (OPN)

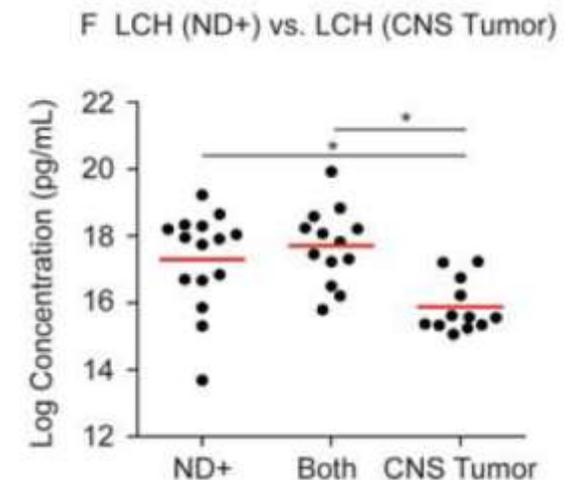
= cytokine pro-inflammatoire sécrétée par de nombreuses cellules (macrophages, LT).

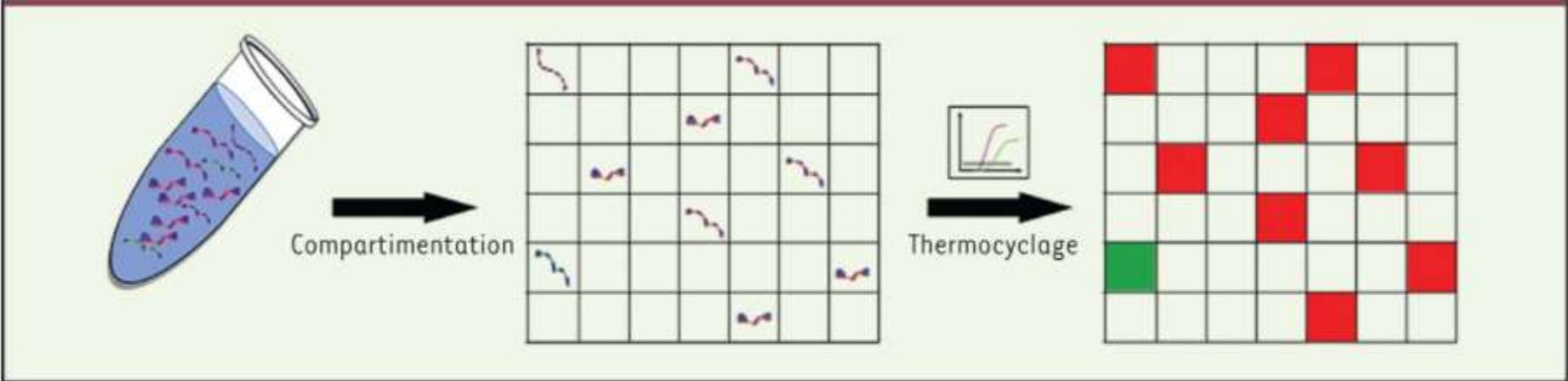
taux élevés dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien ou le cerveau de personnes atteintes de maladies neurodégénératives (SEP, Parkinson, Alzheimer).

Régulation de l'OPN dans les cellules du système nerveux central est inconnue

Plus élevé dans le LCR chez les **HL ND**.

Corrélié avec surexpression de OPN dans les biopsies de tissus cérébraux.

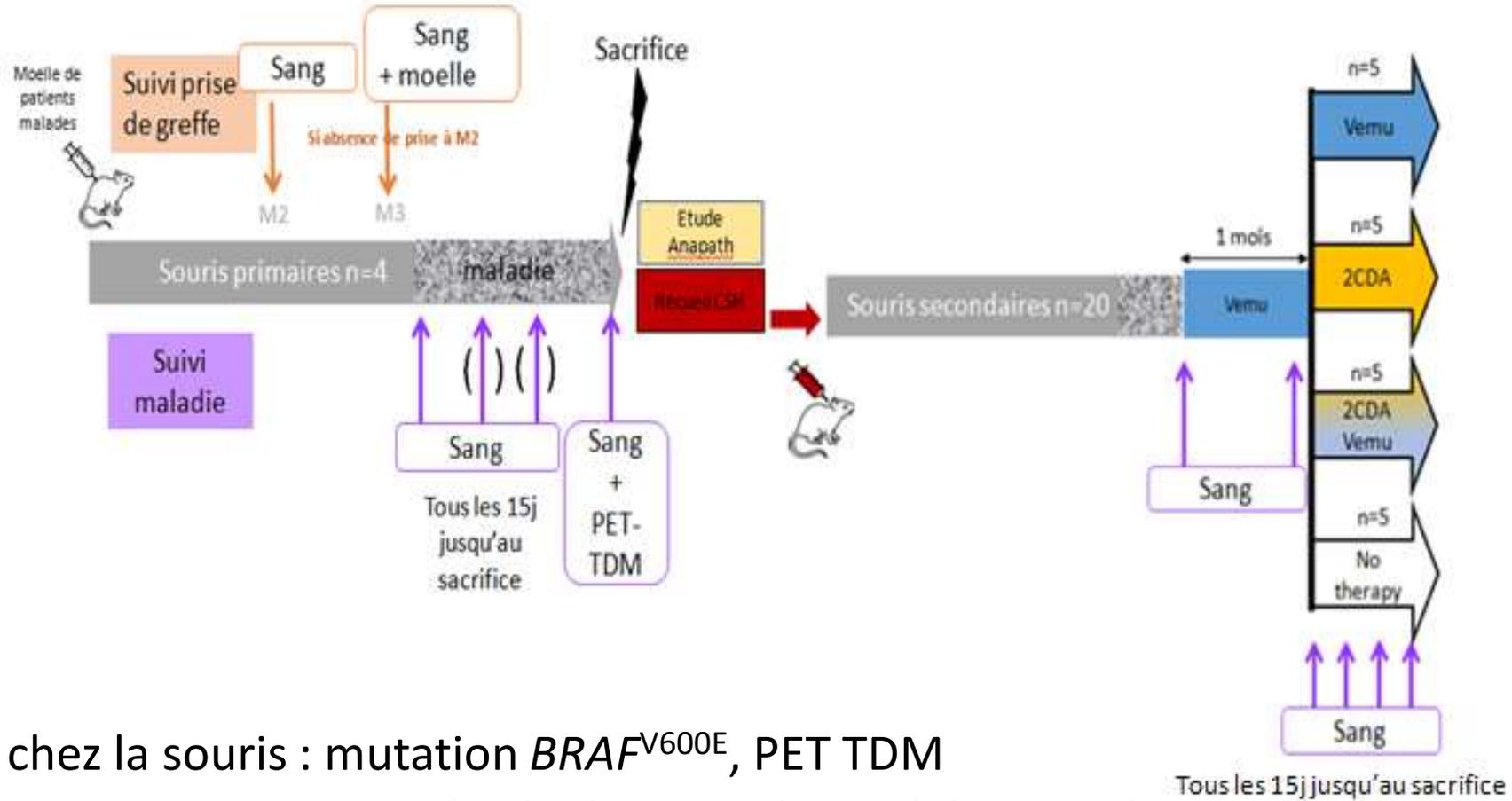




Fraction cellulaire sang	Berres et al. JEM 2014 n=8 (8 HL OR+ du nourrisson)	Milne et al. Blood 2017 n=4 (dont 2 HL multisystémiques pédiatriques)	Schwentner et al. PR 2018 n=3 (3 HL OR+ du nourrisson)
Polynucléaires neutrophiles	—	0/4	—
Monocytes classiques CD14+	8/8 (0.07–5.4%)	4/4 (1.7–20.1%)	2/2 (1–25%)
Monocytes CD16+	—	4/4 (2.7–45.6%)	—
DC myéloïdes classiques	8/8 (0.2–25.2%)	4/4 (1.1–13.7%)	2/2 (1–12%)
DC plasmacytoïdes CD123+ BDCA2+	1/8 (23.5%)	4/4 (0.2–1.9%)	—
Lymphocytes B	3/6 (0.05–1.2%)	1/4 (0.2%)	—
Lymphocytes T	0/6	1/4 (0.03%)	3/3 (5–35%)
Lymphocytes NK	—	0/4	—

Fraction cellulaire moelle	Berres et al. JEM 2014 n=5 (5 HL OR+ du nourrisson)	Milne et al. Blood 2017 n=3 (dont 1 HL multisystémique pédiatrique)
Cellules médullaires CD34+	4/5 (0.01–4%)	—
Cellules médullaires CD14+	5/5 (0.03–15%)	—
Cellules souches hématopoïétiques CD90 ⁺ CD45RA ⁻ CD38 ^{low}	—	3/3 (0.1–0.6%)
Progéniteurs myéloïdes communs CD38 ^{high} CD45RA ⁻	—	3/3 (0.3–12.7%)
Progéniteurs granulocytes/macrophages CD45RA ⁺	—	3/3 (0.6–1.3%)
Progéniteurs lymphoïdes multipotents	—	1/3 (0.2%)
Progéniteurs B/NK	—	0/3

Discussion



En pratique :

- Effet pathogène chez la souris : mutation $BRAF^{V600E}$, PET TDM
- Greffes secondaires (puis tertiaires) afin de disposer de modèles pré-cliniques utilisables et tester des combinaisons thérapeutiques
- Projet sur 5 ans

Matériels et méthodes

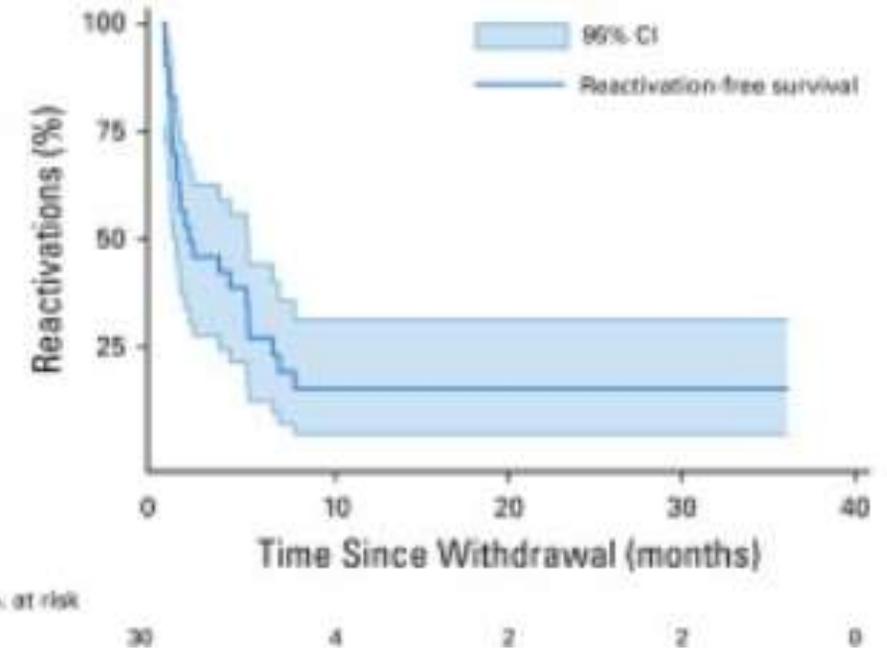
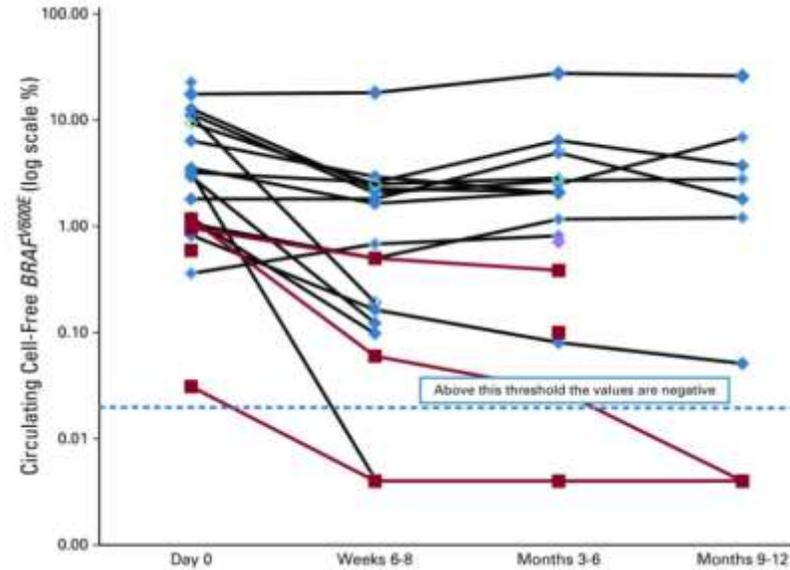
Anémie +/- thrombopénie +/- leucopénie

	Age sexe	Organes atteints	score activité	NFS Hb(g/dL); Ret (G/L) Plq, GB (G/L)			BRAF ^{V600E} ADNlc	Myélogramme (% de chaque lignée) +/- Biopsie ostéo-médullaire (BOM)
P1	1,3 M	Hémato, foie, rate	8	Hb 7,8 GB 3,45 PNN 1,1	Ret - L 2,1	Plq 100 Mono 0,17	0.57% J+15	Dysérythropoïèse. BOM : myélofibrose (grade 3). Infiltrat histiocytaire réactionnel.
P2	0,7 M	Hémato, foie	8	Hb 7,4 GB 10,6 PNN 6,7	Ret 175 L 3,6	Plq 68 Mono 0,32	2.6 % J0	Moelle riche, équilibrée.
P3	1 F	Hémato, hypophyse , peau	4	Hb 7,7 GB 3,5 PNN 0,5	Ret 82,2 L 2,1	Plq 477 Mono 0,7	5.4% J+1	Moelle riche, équilibrée.
P4	1,3 F	Hémato foie, rate	8	Hb 10 GB 11 PNN 4,4	Ret 184 L 6,1	Plq 70 Mono 0,85	0.3% M+9	Nbreux macrophages, hémophagocytose Hyperplasie érythroblastique (46%) Erythroblastes à cytoplasme feuilleté

Contexte scientifique- Modèles murins

Publications	Modèle	cellules	Souris	Phénotype	
Berres, J. Exp. Med, 2014	CRE-Lox BRAFV600E	Promoteur langerine	-	C57 B 6	Maladie atténuée à partir de 12 semaines, MO-.
		Promoteur CD11c	-		Maladie agressive avant 8 semaines, MO+, vie réduite.
Hogstad, J. Exp. Med, 2017	Transplantation secondaire cellules médullaires de souris BRAFV600ECD11c	1-3 à 10 ⁶	C57 B 6 irradiées	Succès transplantation secondaire. Maladie. Efficacité MEKi. Mutation BRAFV600E : hyperexpression BCL2 L1 et baisse expression CCR7	
Durham, Blood, 2017	Xénogreffe médullaires de patients adultes Erdheim Chester.	0.1 à 0.8 10 ⁶ CD34+	NSGS irradiées	Prise de greffe avec souris développant la maladie : 1/8	
Rafeiei, Blood, 2020	Cellules CD34+ du sang de cordon transduites avec mutation BRAFV600E	0.5 à 1 10 ⁶ CD34+	MISTRG irradiées <hr/> NSG irradiées	Chez souris MISTRG et NSG : Lésions HL médullaires, spléniques et pulmonaires. Pas de leucémie à tricholeucocytes.	

Aspect moléculaire



$BRAF^{V600E}$ libre circulant : **Marqueur moléculaire** de la maladie

Histiocytoses sévères (HL OR+) traitées par inhibiteurs de BRAF :

Donadieu, JCO 2019

- Réponse clinique complète constante, mais **récidive** à l'arrêt du traitement
- **Persistance de l'allèle $BRAF^{V600E}$ dans l'ADN libre circulant élevé (5-10%)**
- Prédicatif de la dépendance ?

Problématique

Dépendance thérapeutique aux inhibiteurs de BRAF des formes sévères du nourrisson

- Etudier les cellulaires médullaires des nourrissons HL OR+
- Obtention d'un modèle murin

Contexte scientifique- Single-Cell RNA Sequencing

Transcriptomes cellule unique (**chromium 10x génomique**)

7 biopsies de HL :

- 4 **MS** et 3 **SS**
- 1 **ganglion lymphatique**, 3 **peau** et 3 **os**

Définition du profil transcriptomique des cellules HL CD1a+ CD207+ :

- 14 profils cellulaires de cellules progénitrices → cellules différenciées

Cellules progénitrices

- Prolifératives
- Expression de gènes :
 - régulation cycle cellulaire
 - réparation ADN



Cellules différenciées

- Peu de prolifération
- Expression de gènes :
 - signalisation des cytokines
 - présentation antigène
 - chimiotactisme

Résultats – scRNAseq

	Cellules vivantes après tri	Cellules analysées	Nbre de gènes/ cellule (obj 500-3000)	% barcodes valides (obj 90%)	% reads /cellule (obj 80%)	% relié au transcriptome (obj > 40%)
P1	21 789	6933	1726	97,7	86,2	41,7
P2	25 000	5371	1863	97,6	88,2	43,1
P3	30 000	6091	1862	97,7	89,2	47,1
P4	18 150	3566	1730	97,7	84	36,2

Proportions voisines (CMF et scRNAseq)

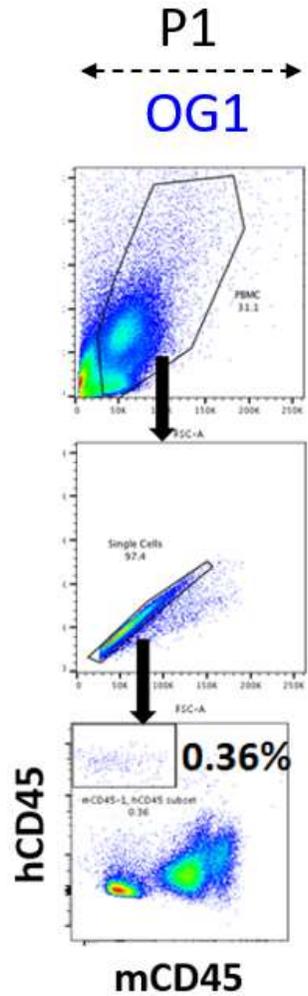
Populations LB et marqueur CD19

Populations LT marqueur CD3

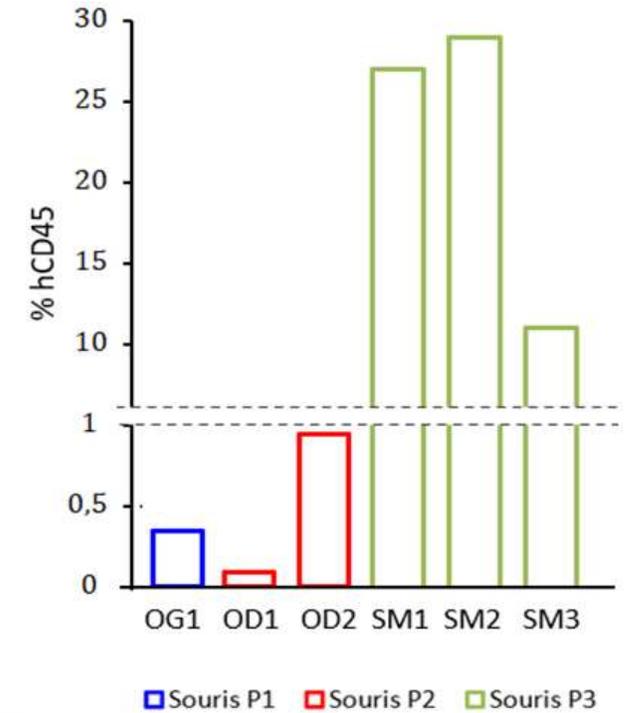
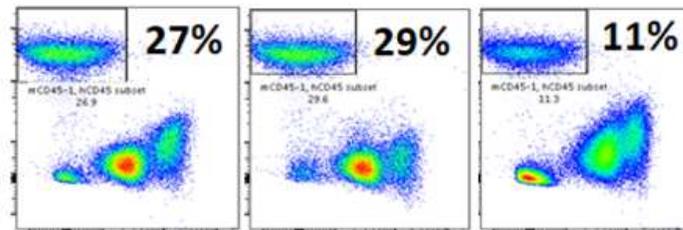
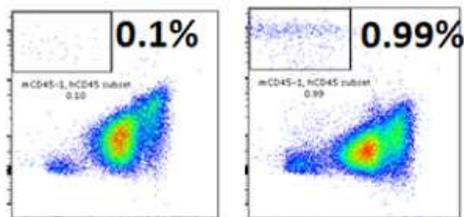
Transcrit CD34 et marqueur phénotypique CD34

	% CD34+	% tCD34+
P1	5%	5,1%
P2	2,4%	1,9%
P3	7%	5,7%
P4	2,7%	1,8%

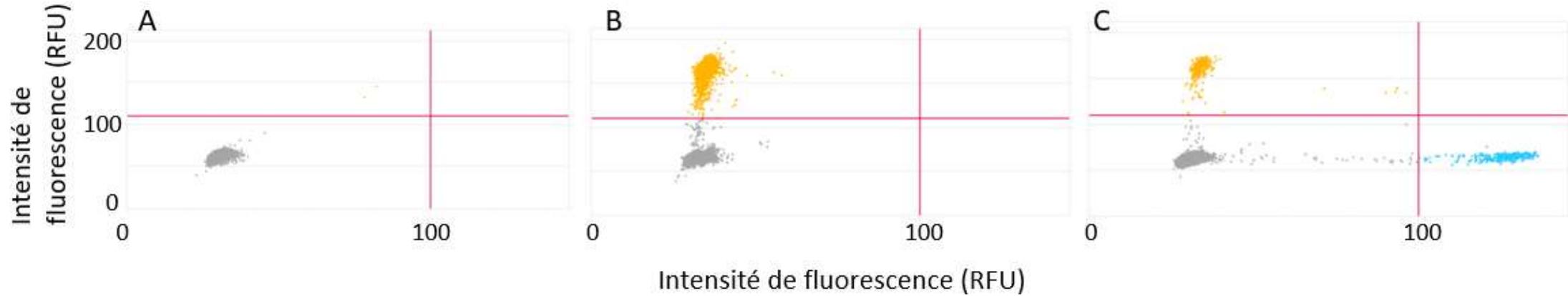
Résultats - xénogreffe



Prélèvement sanguin à 2 mois
Prise de greffe des 6 souris
Pas de GVH

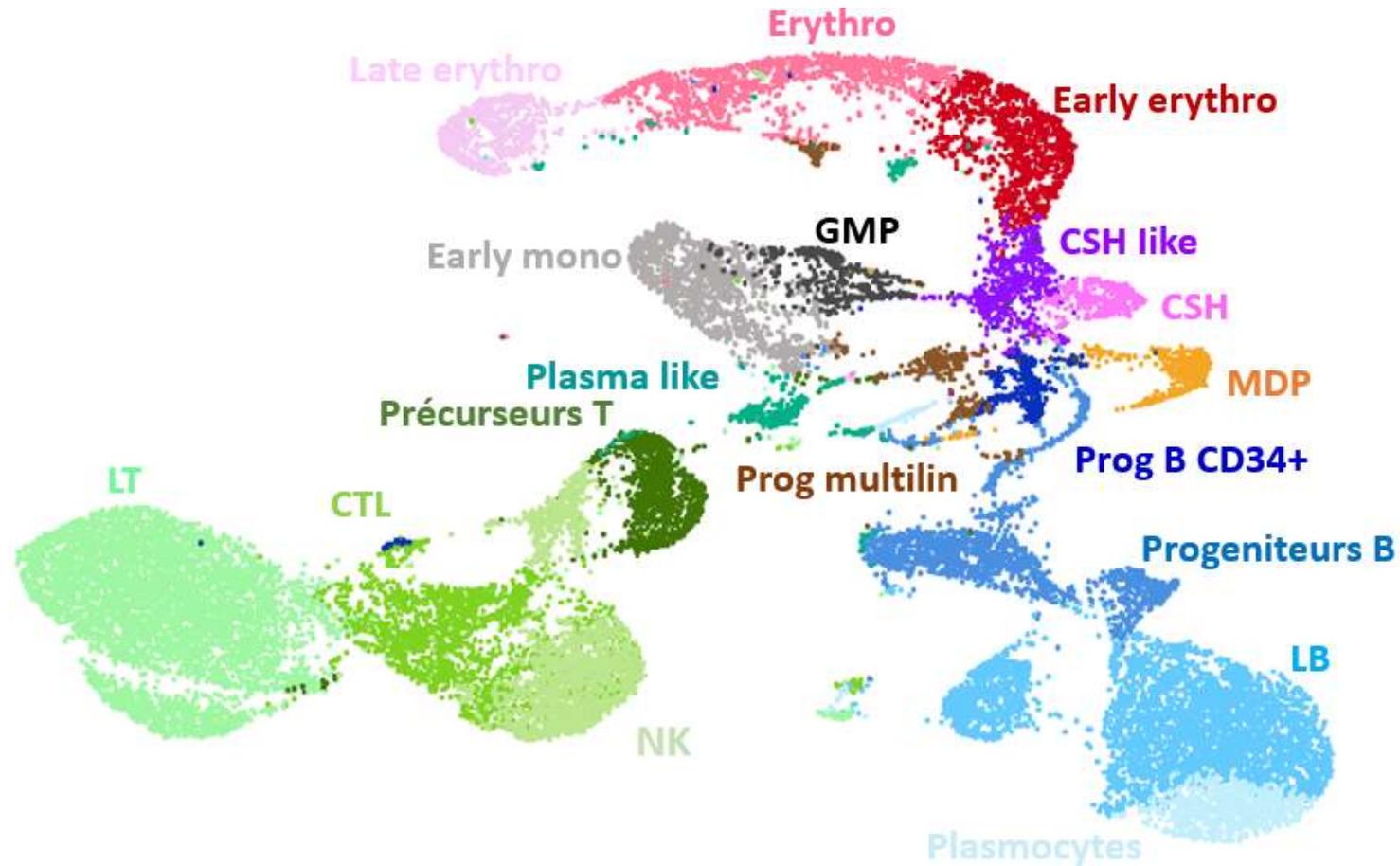


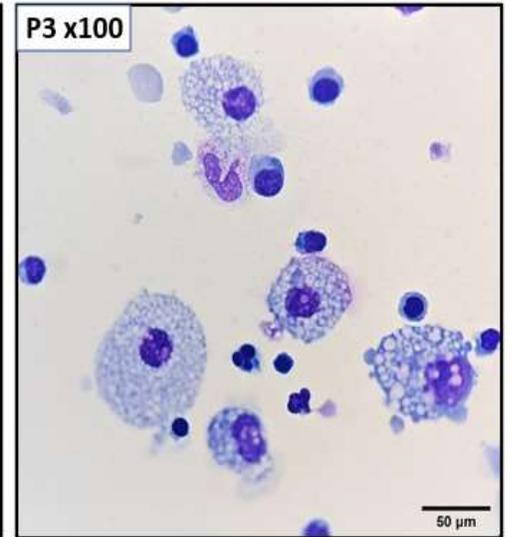
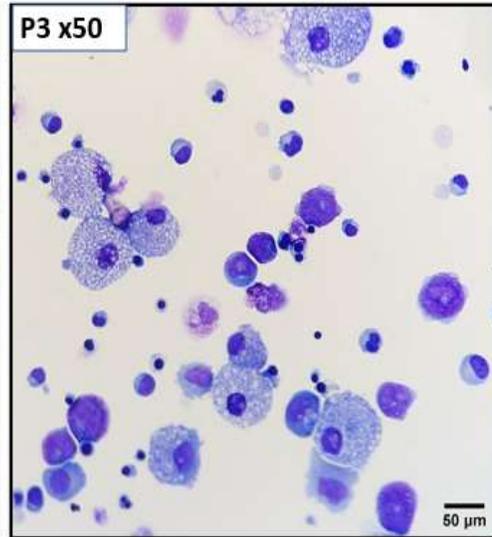
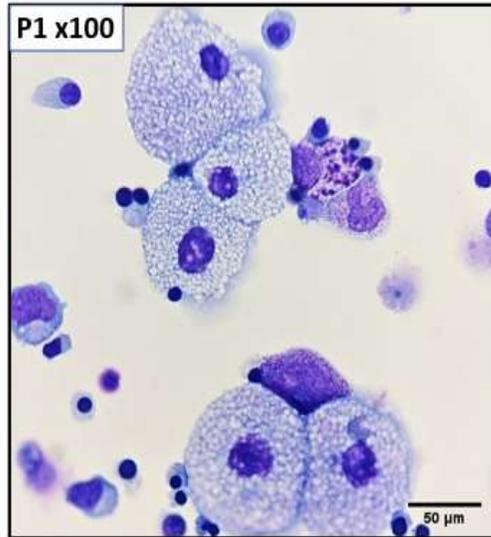
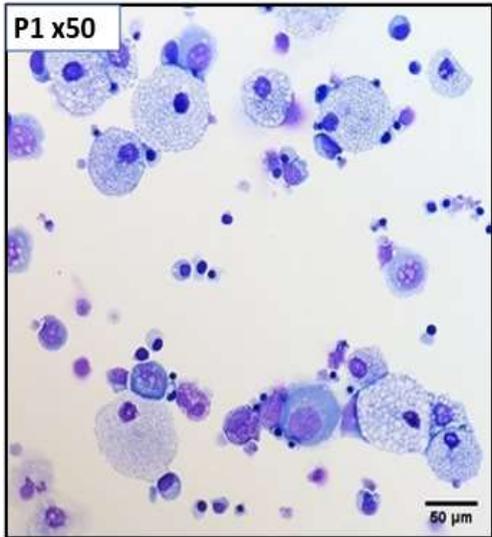
Résultats - moléculaire



Échantillons médullaires décongelés			
	Partitions mutées $BRAF^{V600E}$	Partitions $BRAF$ WT	Fréquence allélique $BRAF^{V600E}$
P1	99	2397	4 %
P2	8	2206	0,4 %
P3	0	2259	0 %
P4	4	3460	0,1%

Résultats – scRNAseq (Aggr)

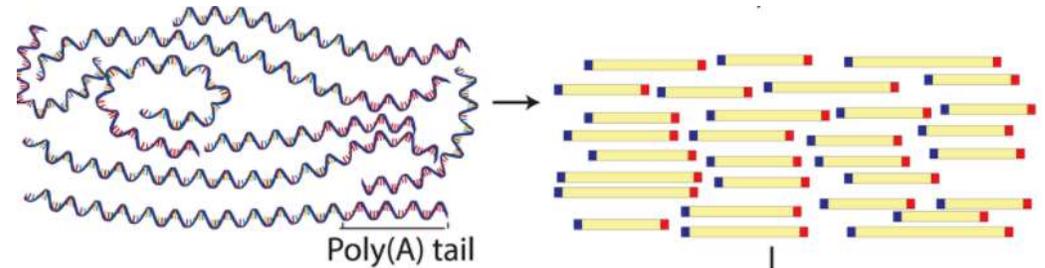


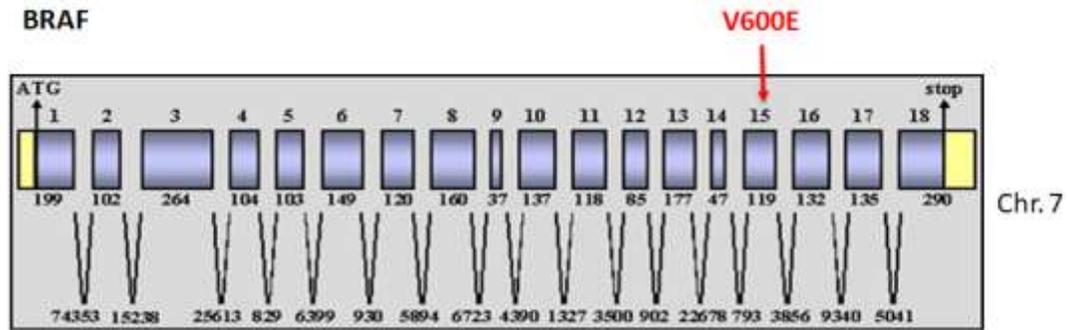


Matériels et méthodes- Single cell RNAseq

Objectif = caractéristiques transcriptionnelles (+/- statut BRAFV600E).

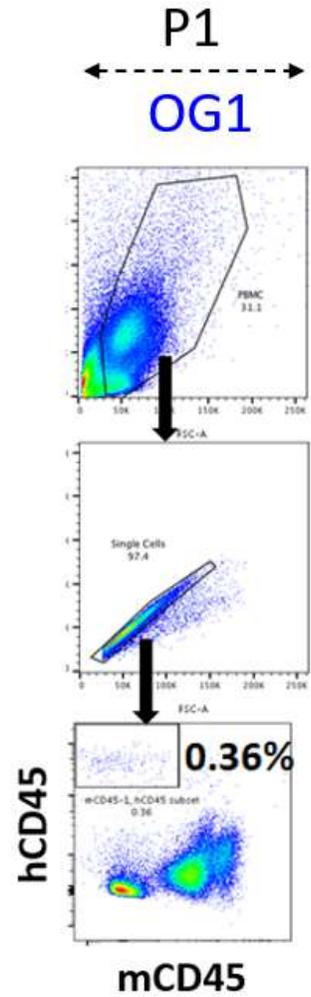
- Lyse cellulaire
- ARNs m capturés (queues polyA).
- Barcode+UMI (séquence aléatoire unique à chaque fragment)
- Convertis en ADNc par Rétrotranscriptase, amplifiés, puis séquencés
- Après séquençage, regrouper à leurs barcodes et obtenir une matrice d'expression par cellules et par gènes
- Analyse bioinformatique : Loupe Browser





- gène qui code pour 766 aa
- V600
- Génération long read à partir de l'extrémité 5' ?

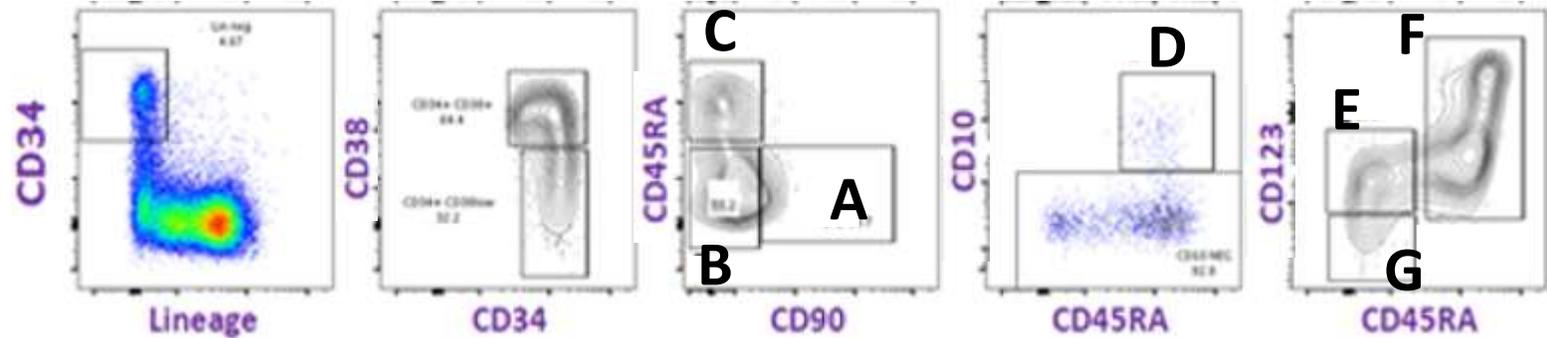
Résultats - xénogreffe



Prélèvement sanguin à 2 mois

Résultats - immunophénotypage

A : HSC
B : MPP
C : LMPP
D : Prog (B/NK)
E : CMP
F : GMP
G : MEP

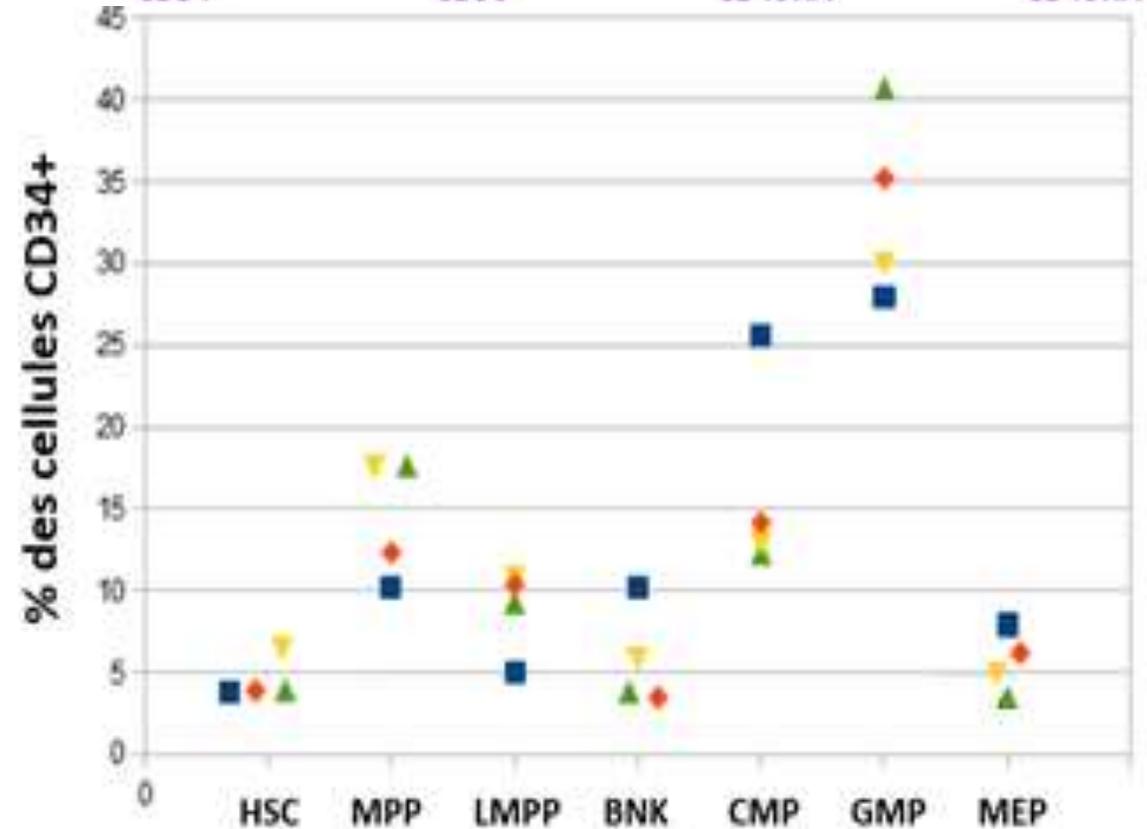


% CD34 entre 2,4 et 7%

Progéniteurs **GMP, MPP** et **CMP**
 en proportions plus importantes.

■ Patient 1 ◆ Patient 2
▼ Patient 3 ▲ Patient 4

Pas de population CD1a+ CD207+



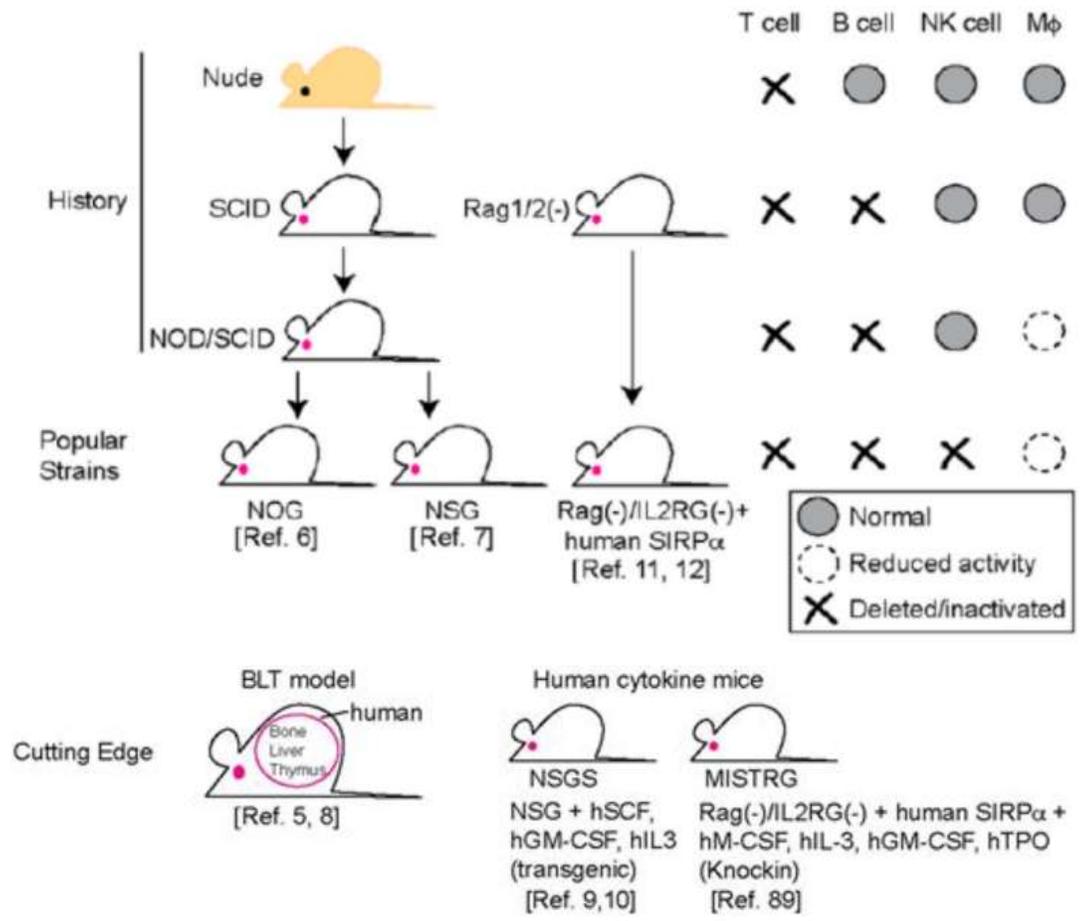
Résultats attendus

Déterminer la cinétique d'évolution de la maladie circulante

Obtention d'un modèle murin

- population clonale mutée *BRAF*^{V600E} se développe
- effet pathogène chez la souris
- étude de la Brafémie chez la souris
- effets d'une thérapie ciblée +/- combiné à d'autres thérapies

Identifier stade de l'hématopoïèse d'acquisition de la mutation oncogénique



- MISTRG = secrètent cytokines (facteur de stimulation des colonies de macrophages, granulocyte-macrophage, interleukine-3, thrombopoïétine) et un transgene le SIRPa humain sur un fond de Rag22/2Il2rg2/2

Les inhibiteurs sélectifs de BRAF

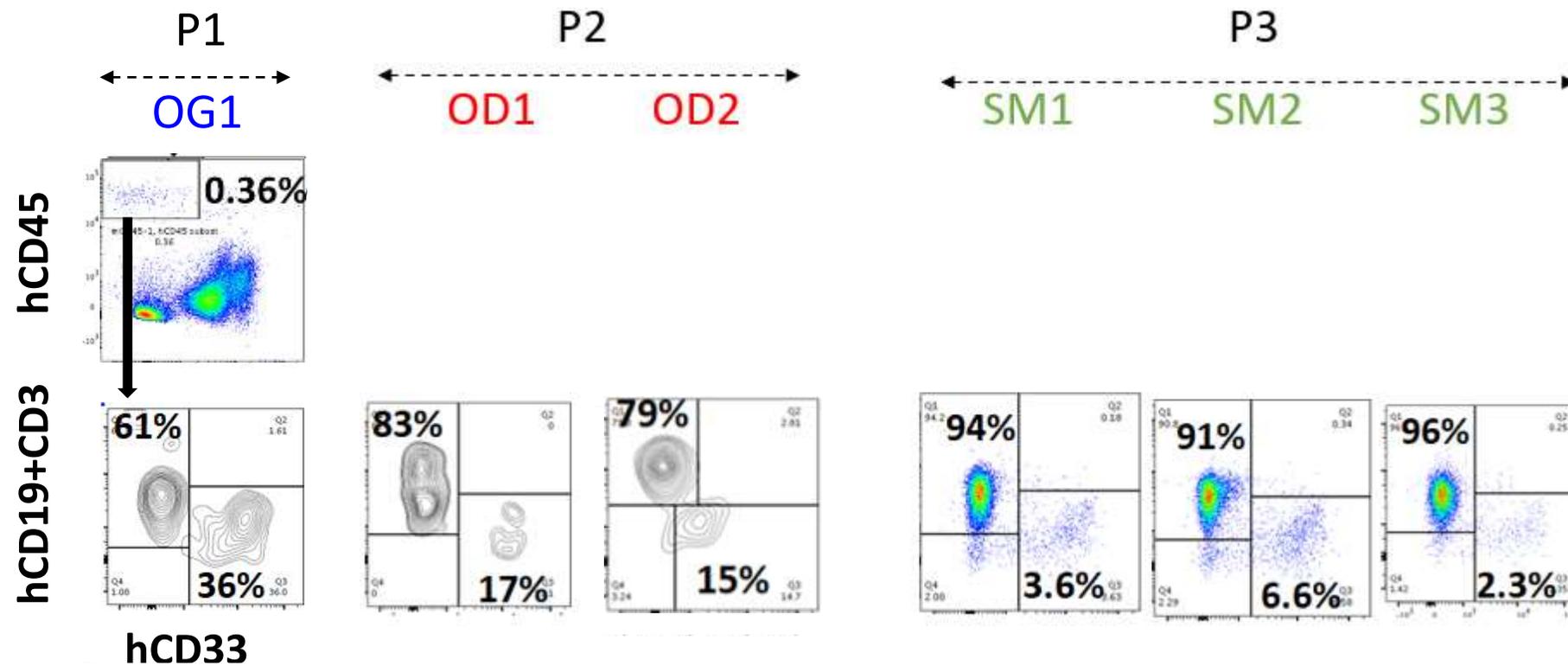


- ✓ Vémurafénib et dabrafénib
- ✓ Bloquent le **domaine de liaison à l'ATP** => pas d'activité kinase
- ✓ Ciblent **BRAF non dimérique en conformation active** sauvage ou muté

⇒ **Efficace essentiellement sur *BRAF*^{V600E}**

⇒ **Inefficace pour les mutations de *BRAF* gardant leur aptitude à former un dimère**

Résultats - xénogreffe



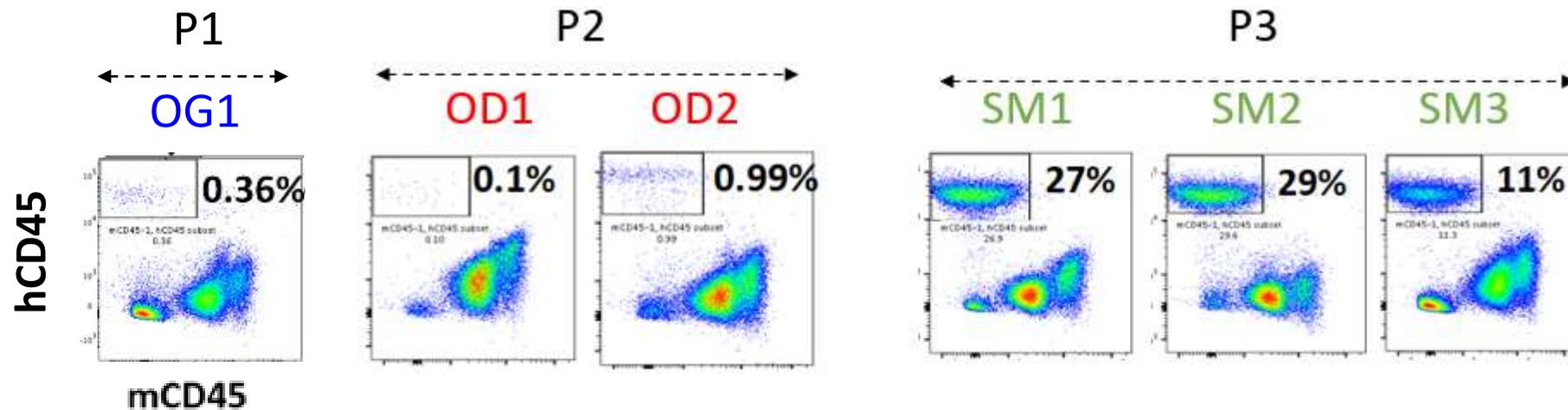
Majoritairement lymphoïde.

Lignée myéloïde présente dans toutes les souris.

Hypothèses

- Le stade de l'hématopoïèse d'acquisition de la mutation BRAF^{V600E} est corrélé à la sévérité et la sensibilité de l'HL aux traitements
- Les sous-types cellulaires porteurs de la mutation BRAF^{V600E} ont une sensibilité différente aux traitements
- Déterminer le stade de l'hématopoïèse d'acquisition de la mutation

Résultats - xénogreffe



Pas de GVH.

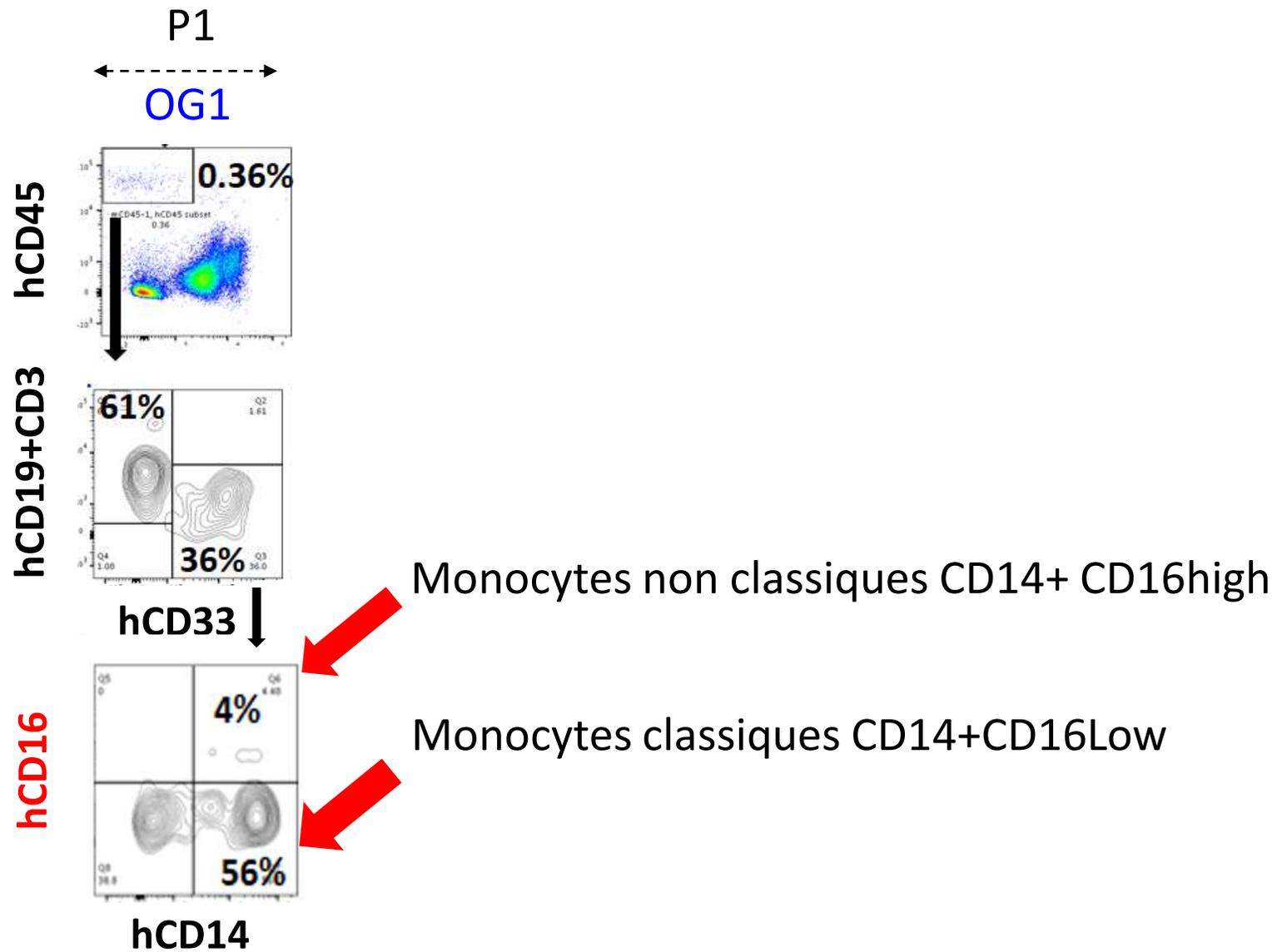
Prélèvement sanguin à 2 mois :

Prise de greffe des 6 souris.

Intérêts cliniques

- ✓ Améliorer le suivi des patients
- ✓ Identifier un marqueur prédictif précoce de réponse au traitement
- ✓ Identifier mécanismes de résistance
- ✓ Pistes pour de nouvelles cibles thérapeutiques

Résultats - xénogreffe



Matériels et méthodes- tri cellulaire

Echantillons sanguins PBMC

Sous pop étudiées: LB, LT, monocytes, pDC, cDC2

Panel Anticorps:

marqueur de viabilité 7-AAD,

CD14-FITC : Monocytes classiques

CD1c-PE Dazzle 594, HLADR-Pacific Blue : cDC2 (mDC) CD14- CD19-CD 3-)

CD123-PC7, HLADR-Pacific Blue : pDC (CD14- CD19-CD 3-)

CD3-PE : LT

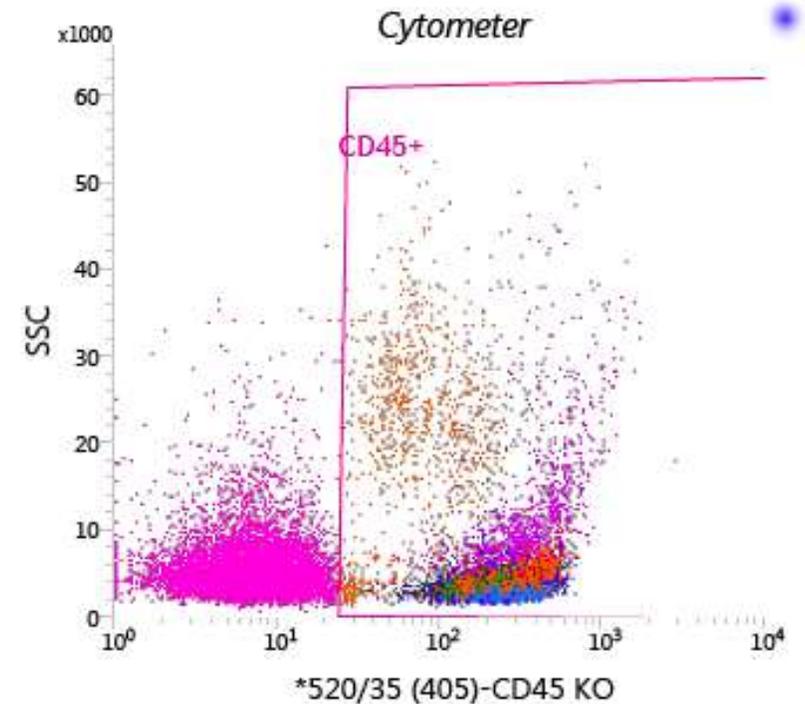
CD19-APC-A750 : LB

CD56-APC: NK

CD45-Krome Orange : marqueur panleucocytaire

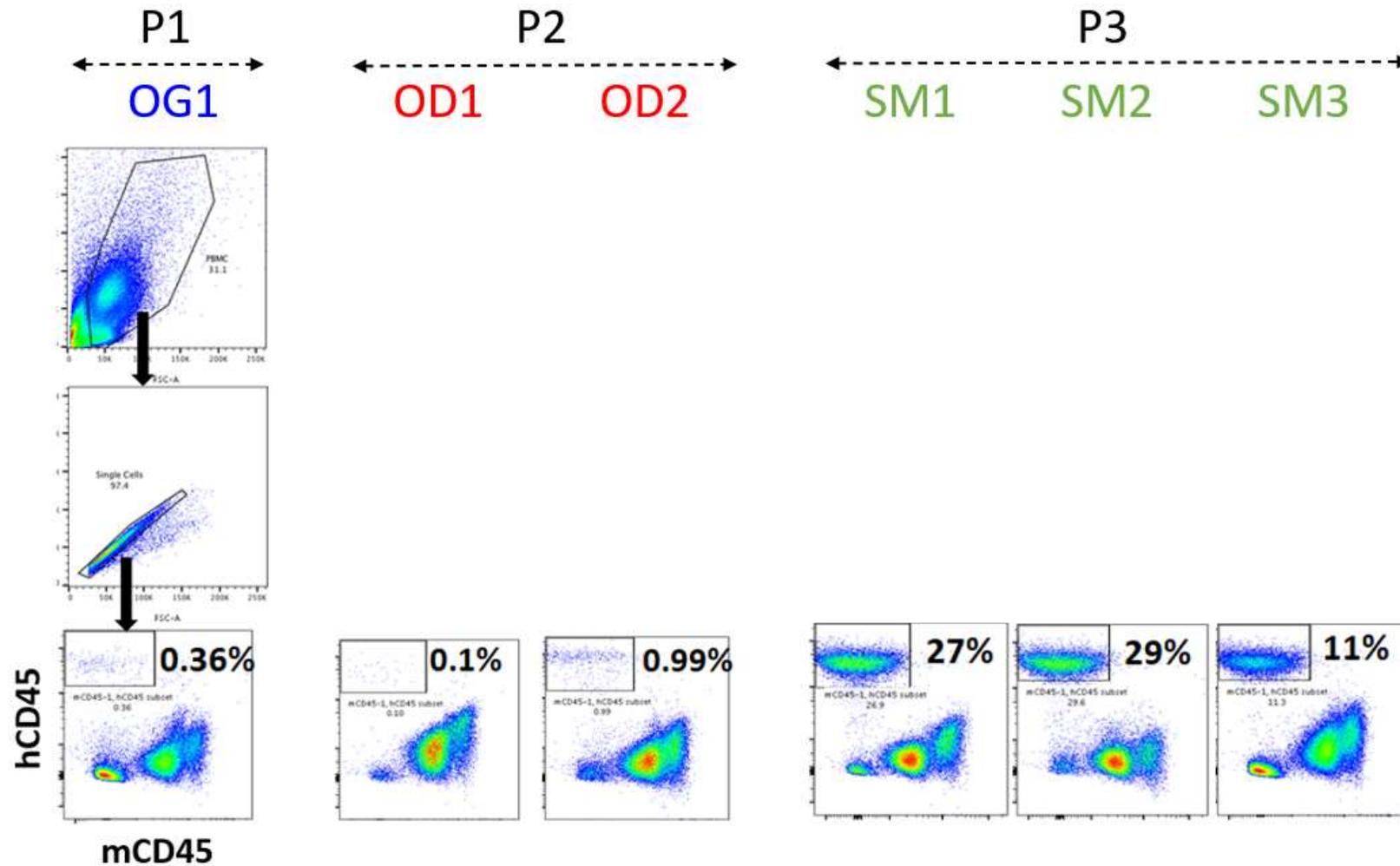
Triées par un cytomètre Influx

Des culots secs de chaque sous population ont été congelés



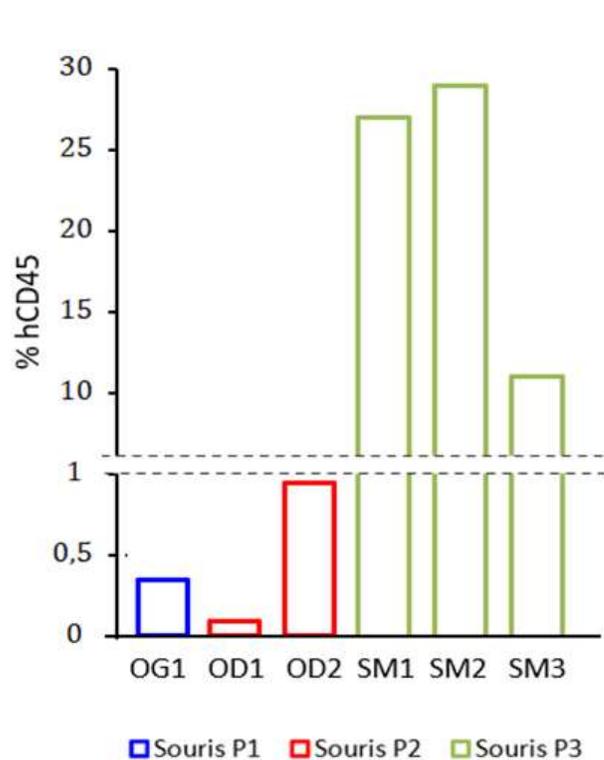
Résultats - xénogreffe

Prélèvement sanguin à 2 mois

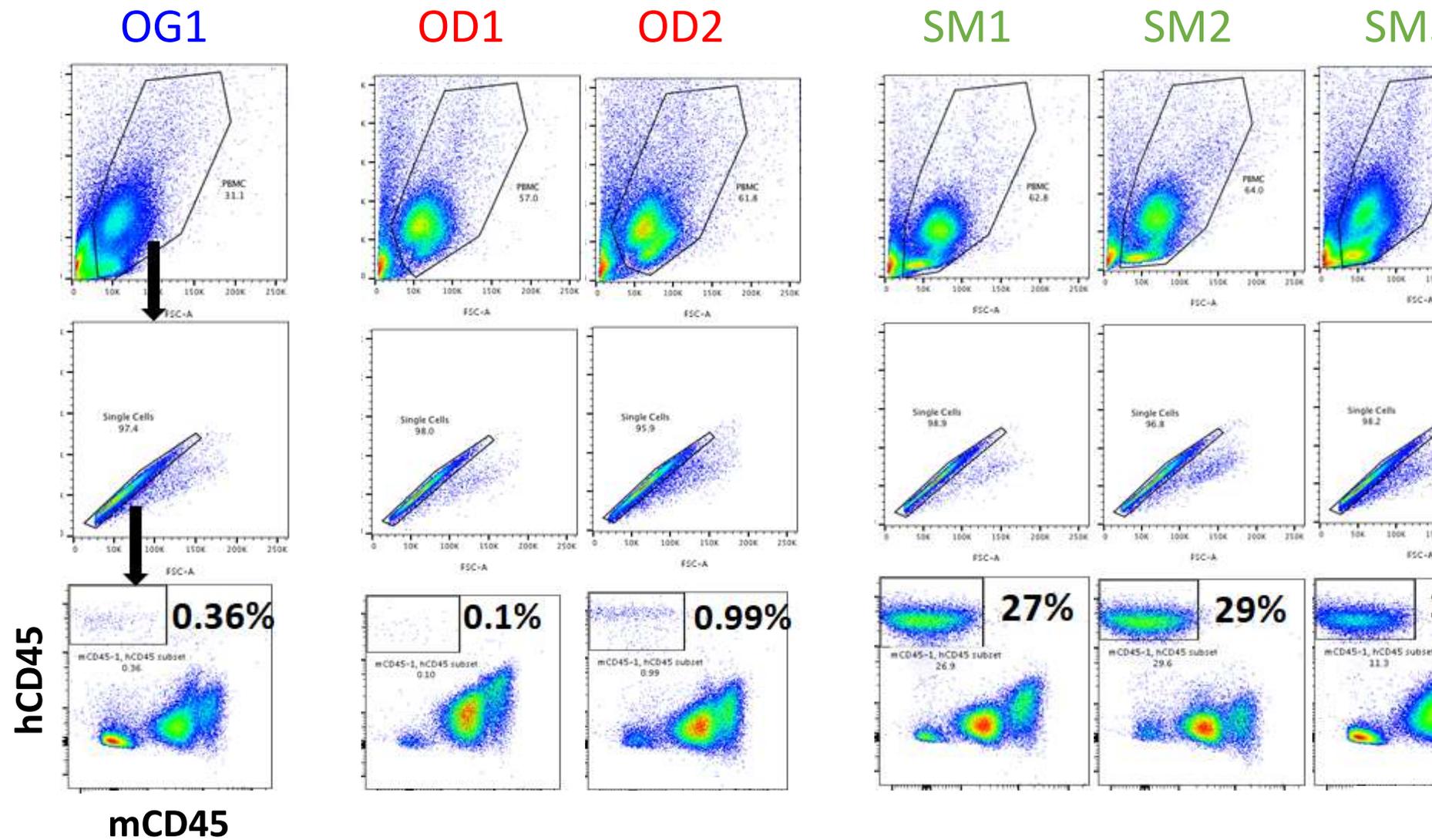


Prise de greffe des 6 souris
Pas de GVH.

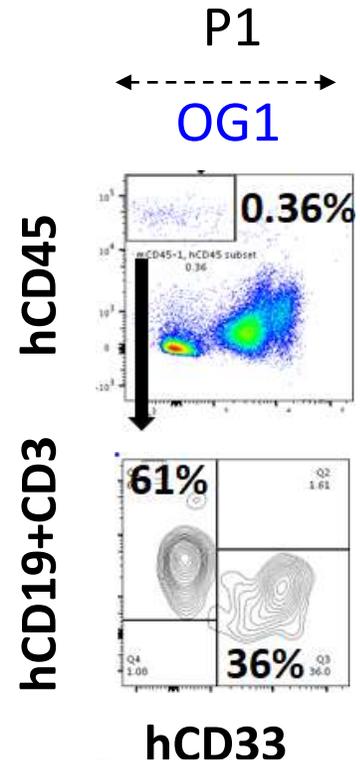
Résultats- xénogreffe Prélèvement sanguin à 2 mois



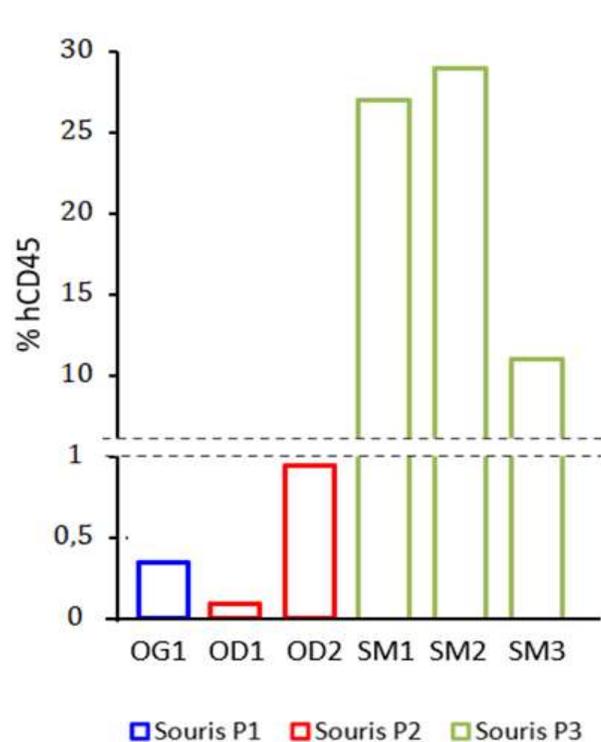
Prise de greffe des 6 souris
Pas de GVH.



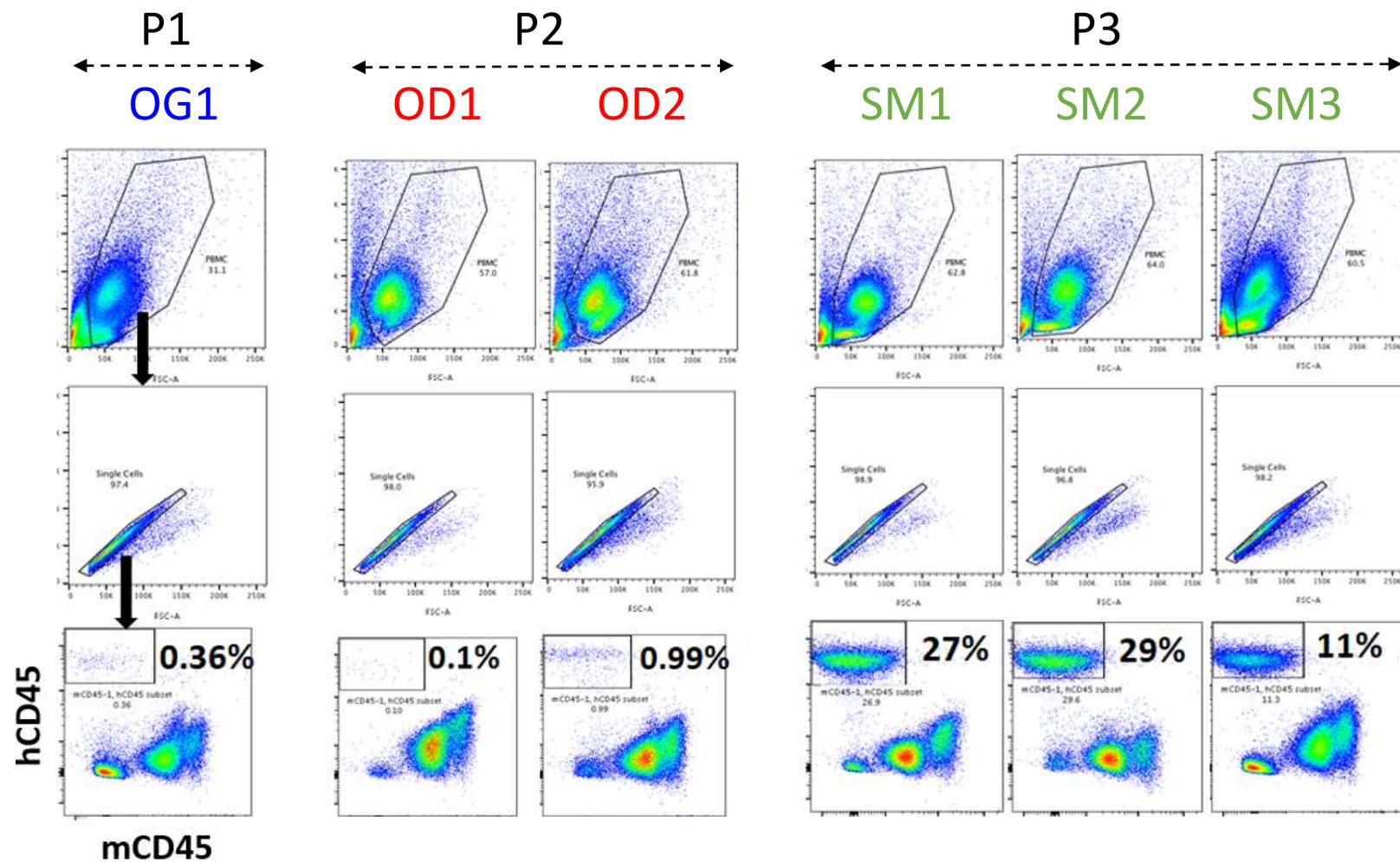
Résultats - xénogreffe



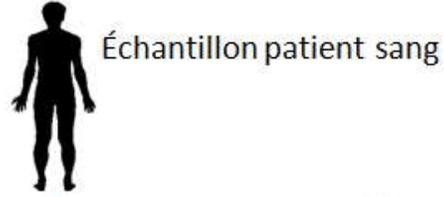
Résultats- xénogreffe



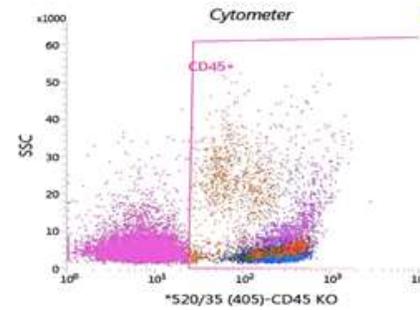
Prise de greffe des 6 souris
Pas de GVH.



Matériels et méthodes

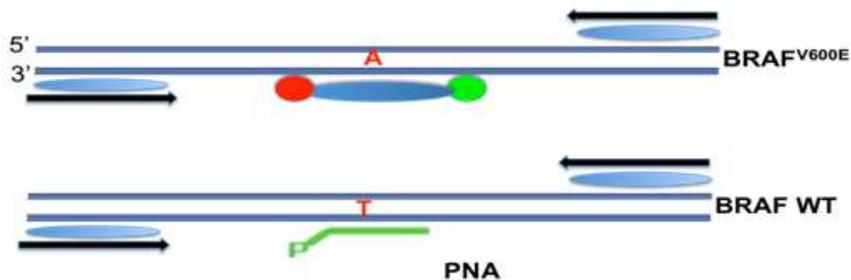


Tri cellulaire par CMF :
LT LB pDC monocytes mDC
Panel 8 anticorps



qPCR ADNg sous pop triées

→ Déterminer % cellules BRAF^{V600E} avec sonde Taqman



Résultats - xénogreffe

