



HAL
open science

Implication de DOK2 dans la prolifération et la génération de cellules myéloïdes suppressives au cours de la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)

Aurélie Labois-Levavasseur

► **To cite this version:**

Aurélie Labois-Levavasseur. Implication de DOK2 dans la prolifération et la génération de cellules myéloïdes suppressives au cours de la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC). Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01225658

HAL Id: dumas-01225658

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01225658v1>

Submitted on 6 Nov 2015

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.

**FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN
ANNÉE 2015**

**THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE
(Diplôme d'État)**

PAR

LABOIS-LEVAVASSEUR Aurélie

Née le 13 Novembre 1985 à Rouen (76)

PRESENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 9 OCTOBRE 2015

**Implication de *DOK2* dans la prolifération et la génération de
cellules myéloïdes suppressives au cours de la leucémie
myélomonocytaire chronique (LMMC)**

Président du jury :	Professeur Hervé Tilly
Directeur de thèse :	Professeur Éric Solary
Membre du jury :	Professeur Fabrice Jardin
Membre du jury :	Docteur Aspasia Stamatoulas

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014 - 2015

U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Stéphane MARRET

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno BACHY (<i>surnombre</i>)	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART (<i>surnombre</i>)	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Guy BONMARCHAND (<i>surnombre</i>)	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr Jean-François CAILLARD (<i>surnombre</i>)	HCN	Médecine et santé au travail
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale

Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN (<i>surnombre</i>)	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN (<i>surnombre</i>)	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Philippe GRISE (<i>surnombre</i>)	HCN	Urologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Xavier LE LOET	HCN	Rhumatologie
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mr Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile

Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Bruno MIHOUT (<i>surnombre</i>)	HCN	Neurologie
Mr Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Jean-Marc PERON (<i>surnombre</i>)	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mr François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale

Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Bactériologie
Mr Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mr Thierry WABLE	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mr Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB santé	Législation pharmaceutique et économie de la
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie

Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mr Jérémie MARTINET	Immunologie
----------------------------	-------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Romy RAZAKANDRAINIBE	Parasitologie
Mr François HALLOUARD	Galénique

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mr Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mr Alain **MERCIER** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med) Inserm 905)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (phar)	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline GAILDRAT (phar)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (phar)	Neurophysiologie
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle TOURNIER (phar)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation SJ – Saint Julien Rouen

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

Remerciements

A Monsieur le Professeur Tilly, qui me fait l'honneur de présider cette thèse. Vous m'avez acceptée comme interne en Hématologie, alors que je me destinais initialement à la Rhumatologie, à une condition : « il va falloir travailler maintenant ». J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes lors de mon internat.

A Monsieur le Professeur Solary, qui m'a acceptée comme étudiante en Master à partir d'un simple mail, et qui me fait l'honneur de diriger cette thèse. Vous m'avez fait découvrir et aimer la LMMC. Grâce à votre esprit vif et synthétique, j'ai pu bénéficier d'une excellente formation en recherche. Si l'Institut Gustave Roussy avait été à Rouen j'aurais adoré y travailler.

A Monsieur le Professeur Jardin, qui m'a tant appris au cours de mon internat et avec lequel je découvre actuellement la recherche dans les pathologies lymphoïdes. Tu es une source inépuisable de connaissances pour le service d'Hématologie de Rouen, et pour tous les hématologues !

A Madame le Docteur Stamatoulas, qui m'a accompagnée durant toutes ces années d'internat, avec son dynamisme, sa générosité et sa bonne humeur contagieuse. Tes patients ont de la chance de t'avoir.

A Anne-Lise, qui m'a dit lors de la répartition des stages en D4 : « l'hématologie c'est bien, tu devrais y faire un stage ». Nous voilà maintenant toutes les deux sur le point d'être Docteur en Hématologie.

A Emilie, la première hématologue que j'ai rencontrée lors de mon externat.

A Nathalie Contentin, Nathalie Cardinael, Marie-Laure et Pascal qui m'ont connu lors de mes débuts en hématologie, lorsque j'étais externe.

A Ophélie, qui m'a pris sous son aile lors de mon premier semestre en Hématologie, m'a appris à être rapide et efficace. Je ne sais pas si j'arrive à ta hauteur mais j'y travaille.

A Hélène et ses ptits vieux, Stéphane et ses patients qui vont bien, qui complètent la famille de l'Hématologie.

A mes co-internes d'hématologie :

Mickaël, mon binôme du premier stage, Vincent, que nous avons débauché de l'Oncologie, Marion qui a deux passions, l'hémato et les animaux, Imène et Bénédicte.

A mes co-internes que j'ai croisé durant tous mes stages : médecins, pharmaciens, biologistes, pneumologues, néphrologues, oncologues, rhumatologues, nucléaristes et j'en passe. J'ai adoré travailler avec vous. Merci à Florian qui m'a débauché de la Rhumatologie, mais n'a pas réussi à me faire devenir oncologue.

A toutes les équipes de Becquerel, du rez de jardin au septième étage en passant par l'ancien bâtiment, aux infirmières, techniciennes, aides-soignantes, ASH, ... Je suis (presque) toujours venue à Becquerel avec le sourire et c'est en partie grâce à vous, à votre générosité et à votre qualité de travail.

Merci à Babeth, Sabine, Evelyne, Manu, Sylvie et merci à toutes les secrétaires qui facilitent notre travail d'interne.

Au service de Rhumatologie d'Elbeuf, Fernando et Maud, qui ont accepté de me laisser partir pour l'Hématologie

Au laboratoire de l'IBC, M. Lenormand, Gérard et Marie-Paule, grâce auxquels je sais lire un myélogramme et faire de la cytométrie de flux.

A Madame Bastit et à l'équipe de la thérapie cellulaire : découvrir une nouvelle facette de l'hématologie est toujours enrichissant et travailler à vos côtés est un plaisir.

A mon équipe parisienne, l'U1009 : Nathalie, Margot, Marie-Astrid, Dorothee, Elodie, Jane, Stéphanie et Laura : cette thèse a pu voir le jour grâce à vous. Merci à Nolwenn même si je ne la connais que par mail.

A mes parents, sans qui je n'aurais jamais pu être Médecin, qui sont présents depuis le début, et m'ont soutenue lors de toutes ces années. Si j'en suis là c'est grâce à vous. Papa, tu n'auras plus besoin de me coacher pour que je révise. Maman, tu n'auras plus besoin de me sortir pour que j'arrête de réviser.

A Baptiste, qui est à mes côtés chaque jour, m'accompagne, me soutient et me supporte : Il en faut du courage ! Ta patience et ton calme sont d'un grand réconfort durant ces périodes studieuses. Tu es un formidable mari et un adorable papa.

A mon Robinou, qui me fait voir le monde autrement et apprécier chaque jour de la vie.

A mes frères et sœurs, Céline, Sophie et Mathieu, (et tous les conjoints et enfants), qui ne savent jamais en quelle année de médecine je suis, mais qui m'encouragent quand je leur dit que ce n'est pas encore fini. Le bébé a grandi ! Merci pour tous ces moments partagés ensemble, pour m'avoir emmenée au concert de Muse en P1, pour avoir accueilli la petite sœur chez vous de nombreuses fois. Et Mathieu, nous sommes deux docteurs dans la famille maintenant !

A Virginie et Thibault : nous avons partagé ensemble tant de moments, et la rédaction des thèses en faisait partie...Merci pour cette complicité de chaque instant.

A mes amies Fanny, Clémence et Camille, avec lesquelles nous avons traversé toutes ces années d'études : je suis la dernière interne, je vous rejoins bientôt dans le clan des médecins.

Lexique des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ASXL1 : additional sex combs-like 1
BCR-ABL : breakpoint cluster region-Abelson
CBL : casitas B-lineage lymphoma
CD : cluster of differentiation
C/EBP ϵ : CAAT-enhancer binding protein ϵ
CSH : cellule souche hématopoïétique
DNMT3A : DNA(cytosine-5)méthyltransférase 3A
dNTP : desoxy-nucleotide-triphosphate
DTT : dithio-thréitol
EDTA : ethylene diamine tetra-acetic acid
EFS : établissement français du sang
EGR : early growth response
ERK : extracellular regulated MAP kinase
EZH2 : enhancer of zeste homolog 2
FAB : classification française, américaine et britannique
FLT3 : fms-like tyrosine kinase receptor-3
FLT3-L : fms-like tyrosine kinase receptor-3 ligand
FR, FP635 : far fed
G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor
GFP : green fluorescence protein
GM-CSF : granulocytes-monocyte colony stimulating factor
GMP : granulocyte-macrophage precursors
GTP : guanine triphosphate
HPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
IDH : isocitrate déshydrogénase
IL : interleukine
iNOS : inducible nitric oxyde synthase
IPSS : international pronostic score system
JAK2 : janus kinase 2
K-RAS : kirsten rat sarcoma oncogene
LAM : leucémie aiguë myéloblastique
LMC, LMCa : leucémie myéloïde chronique, leucémie myéloïde chronique atypique
LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique
MAPK : mitogen activated kinase-like protein

M-CSF : macrophage colony stimulating factor
MDSC : myeloid derived suppressor cell, cellule myéloïde suppressive
MEK : MAP ERK kinase
MEP : megakaryocyte-erythroid progenitor
MLL : mixed lineage leukemia
cMYB : myeloblastosis oncogene
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NAC : N-acéthyl-cystéine
NK : natural killer cell
NO : nitric oxyde
NPM : nucléophosmine
N-RAS : neuroblastoma rat sarcoma oncogene
OMS : organisation mondiale de la santé
PBMC : peripheral blood mononuclear cells
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PDGFRA, PDGFRB : platelet-derived growth factor receptor, α / β
PI3K : phosphoinositide-3-kinase
RANK ligand : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RLO : radicaux libres de l'oxygène
RNase : ribonucléase
ROS: reactive oxygen species
RPMI : roswell park memorial institute
RT-qPCR : reverse transcription-quantitative-polymerase chain réaction
RUNX1 : runt-related transcription factor 1
SCF : stem cell factor
SCR : scramble
SF3B1 : splicing factor 3B subunit 1
SRSF2 : serine/arginine splicing factor 2
SVF : sérum de veau foetal
TET2 : ten-eleven translocation2, tet oncogen family number 2
TIF1 γ : transcriptional intermediary factor 1 gamma
TPO : thrombopoïétine
UTR : untranslated region
UTX : ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome
ZRSR2 : zinc finger, RNA-binding motif and serine/arginine rich 2

SOMMAIRE

I. Introduction	17
A. La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)	17
B. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)	26
C. La protéine DOK2	30
D. Prérequis et problématique	34
II. Matériels et méthodes	39
A. Culture, infection et différenciation des cellules CD34 ⁺	39
B. Patients atteints de LMMC	42
C. Statistiques	45
III. Résultats	47
A. Cellules CD34 ⁺ infectées par le sh <i>DOK2</i> ou le sh <i>SCR</i> (contrôle)	47
B. Patients atteints de LMMC	50
C. Conséquences de la sous expression de <i>DOK2</i> sur les caractéristiques de la LMMC	54
D. Expression de <i>DOK2</i> , MDSC, prolifération et survie	60
IV. Discussion	62
A. La diminution d'expression de <i>DOK2</i> est un facteur pronostique dans divers cancers	63
B. La diminution de <i>DOK2</i> dans les cellules hématopoïétiques favorise leur prolifération et affecte leur différenciation	63
C. Les formes prolifératives de LMMC sont de mauvais pronostic	64
D. La diminution de <i>DOK2</i> est associée à l'accumulation de MDSC	66
E. La diminution de l'expression de <i>DOK2</i> est d'origine épigénétique	68
F. L'observation d'une baisse de <i>DOK2</i> ouvre des perspectives thérapeutiques	69
V. Conclusion	70

I. Introduction

A. La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)

1. Définition – Diagnostic

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie maligne clonale de la cellule souche hématopoïétique (CSH). C'est le plus fréquent des syndromes myélodysplasiques/néoplasmes myéloprolifératifs (SMD/NMP) définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2008 ^{1,2}.

Sur le plan épidémiologique, l'incidence annuelle de la maladie est inférieure à 0,5/100 000 habitants mais elle est peut-être légèrement sous-estimée car la monocytose est parfois négligée dans un contexte de myélodysplasie, l'impact thérapeutique de sa reconnaissance étant encore limité ³. L'âge médian au diagnostic est de 72 ans et la maladie est très rare avant 50 ans. L'homme est deux fois plus souvent atteint que la femme ^{4,5}.

Dans la classification Française-Américaine-Britannique (FAB) de 1994, la première à identifier une entité appelée « leucémie myélomonocytaire chronique », la leucocytose permettait de définir deux sous-groupes ^{6,7} :

- la LMMC dysplasique, avec un taux de leucocytes inférieur à 13 Giga/L,
- la LMMC proliférative, avec un taux de leucocytes supérieur à 13 Giga/L.

En 2000, l'OMS a validé l'existence de cette entité et l'a incluse dans un nouveau groupe d'hémopathies myéloïdes associant prolifération et dysplasie cellulaire, la LMMC en étant le principal représentant ⁸.

Elle a également identifié un seul facteur pronostique pour cette pathologie, le pourcentage de blastes périphériques et médullaires, et a défini deux types de LMMC :

- LMMC de type 1, avec un taux de blastes circulants inférieur à 5%, et un taux de blastes médullaires inférieur à 10%,
- LMMC de type 2, avec un taux de blastes circulants entre 5 et 19% et un taux de blastes médullaires entre 10 et 19%.

En 2008, l'OMS a créé l'entité des syndromes myélodysplasiques/néoplasmes myéloprolifératifs qui regroupe la LMMC, la leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ), la leucémie myéloïde chronique atypique (LMCa) et les SMD/NMP inclassables ². La LMMC représente 90% des hémopathies de cette nouvelle classe d'hémopathies malignes. En outre, l'OMS a provisoirement rattaché à ce groupe les anémies réfractaires sidéroblastiques avec thrombocytose.

Le diagnostic de leucémie myélomonocytaire chronique est évoqué sur l'hémogramme montrant une monocytose, parfois associée à une hyperleucocytose ou à des cytopénies.

Cette maladie est définie par un critère positif unique, une monocytose sanguine supérieure à 1 Giga/L pendant plus de trois mois ².

Ainsi, une monocytose réactionnelle doit être écartée en éliminant les pathologies suivantes ⁹ :

- Pathologies infectieuses : infections bactériennes et plus particulièrement la tuberculose, l'endocardite infectieuse, la brucellose ; infections virales et fongiques,
- Maladies inflammatoires chroniques : maladies auto-immunes comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou la polyarthrite rhumatoïde,
- Cancers solides, par exemple dans le cadre de syndromes paranéoplasiques.

Avec l'aide de la cytologie, de la cytogénétique et de la biologie moléculaire, on s'assure également:

- D'un pourcentage de blastes (hémoblastes + myéloblastes + monoblastes + promonocytes) inférieur à 20% dans la moelle et le sang, qui signerait une leucémie aiguë,
- De l'absence de chromosome Philadelphie ou de gène de fusion *BCR-ABL*, permettant d'éliminer la leucémie myéloïde chronique (LMC),
- De l'absence de réarrangement impliquant les gènes *PDGFR-A* ou *PDGFR-B*, qui traduirait une néoplasie myéloïde/ lymphoïde avec éosinophilie.

A la lecture du myélogramme, il existe fréquemment une dysplasie d'au moins une lignée myéloïde. En l'absence de celle-ci, la présence d'une anomalie cytogénétique ou moléculaire clonale et acquise de la cellule souche hématopoïétique, associée à une monocytose persistant trois mois, affirment le diagnostic.

En 2015, D. Selimoglu-Buet et al. ¹⁰ a montré que la cytométrie de flux permettait le diagnostic de LMMC de manière simple et rapide, en se basant sur l'analyse des trois populations monocytaires ¹¹. Chez un sujet sain, la population monocyttaire se répartit en trois sous-types en fonction de l'expression du CD14 et du CD16 :

- Les monocytes dits classiques, ou MO1, expriment le CD14 mais pas le CD16, et représentent 85% des monocytes totaux,
- Les monocytes intermédiaires, ou MO2, expriment le CD14 et le CD16,
- Les monocytes non classiques, ou MO3, expriment le CD14 de manière faible et le CD16.

En cas de LMMC, la population de monocytes classiques augmente de manière importante pour arriver au-dessus d'une valeur seuil de 94% de la population monocyttaire totale, aux dépens des deux autres sous-types. Ceci n'est jamais observé chez le sujet sain, ni en cas de monocytose réactionnelle ou d'autre hémopathie. Ce test diagnostique a une sensibilité de 94% et une spécificité de 91%, et permettrait de s'affranchir des trois mois de suivi d'une monocytose supérieure à 1 Giga/L dans les diagnostics douteux.

2. Cytogénétique- Génétique

L'analyse cytogénétique de la moelle osseuse de patients atteints de LMMC a permis de montrer qu'environ 20 à 30% d'entre eux présentaient une anomalie de leur caryotype dont les plus fréquentes sont la trisomie 8, la perte du chromosome Y, la monosomie 7, et les délétions ou insertions des chromosomes 20q, 12p, 7q et 13q¹². Cependant, aucune de ces anomalies n'est spécifique de la LMMC et elles sont souvent retrouvées dans les syndromes myélodysplasiques¹³.

Au cours des cinq dernières années, l'analyse génétique des cellules tumorales a montré qu'il existait en moyenne quatorze gènes mutés dans le clone leucémique d'une LMMC¹⁴⁻¹⁶. Elle a permis d'identifier parmi ceux-ci les gènes mutés de façon récurrente. Il s'agit de gènes impliqués :

- dans la régulation de l'épigénétique : méthylation (*DNMT3A*) ou déméthylation de l'ADN (*TET2*, *IDH1* et *IDH2*), modification des histones (*ASXL1*, *EZH2*, *UTX*, *SETBP1*),
- dans l'épissage alternatif (*SRSF2*, *ZRSR2*, *U2AF35*, *SF3B1*, *LUC7L2*)¹⁷
- dans la signalisation cellulaire (*CBL*, *N-RAS*, *K-RAS*, *JAK2*, *FLT3*, *CSF3R*),
- et dans la régulation transcriptionnelle (*RUNX1*, *NPM1*).

Comme pour les anomalies cytogénétiques, aucune de ces mutations n'est spécifiques de la LMMC, mais les trois gènes les plus souvent mutés sont *TET2* (40- 60%), *SRSF2* (30- 50%) et *ASXL1* (près de 40%). Viennent ensuite les gènes de la voie RAS, comme *NRAS* ou *CBL*^{3,18}.

Les premières mutations apparaissant dans la LMMC semblent souvent affecter un gène de l'épigénétique, comme *TET2* ou *ASXL1*, puis un gène de l'épissage ou un gène de la signalisation, mais tous les ordres d'apparition sont possibles. La dominance clonale est précoce, affectant les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺.

Les mutations s'accumulent ensuite linéairement dans les cellules les plus immatures. C'est ce que l'on appelle l'architecture clonale¹⁴.

Les mutations affectant les voies de signalisation apparaissent souvent secondairement chez une partie des patients générant les formes prolifératives de la maladie. Les cellules les plus mutées ont un avantage lors de la différenciation hématopoïétique et sont majoritaires dans le sang circulant. Si les gènes mutés sont nombreux, seules les mutations d'*ASXL1* ont un impact pronostique péjoratif en analyse multivariée.

Indépendamment de ces mutations géniques, l'altération de l'expression de certains gènes par des mécanismes épigénétiques joue probablement un rôle dans la physiopathologie de la LMMC. Une réduction très importante de l'expression du gène *TIF1γ*, aussi appelé *TRIM33*, due à une hyperméthylation de son promoteur, a été observée dans les cellules leucémiques de 35 à 40% des patients atteints de LMMC¹⁹. Renforçant cette observation, la délétion du gène *tif1γ* dans les cellules myéloïdes induit chez la souris de plus de six mois un phénotype de LMMC²⁰.

3. Clinique

Sur le plan clinique, la maladie peut être asymptomatique, le diagnostic se faisant fortuitement sur un contrôle de l'hémogramme montrant une monocytose associée ou non à des cytopénies²¹. Elle peut également se manifester par divers symptômes qui diffèrent d'un individu à l'autre et ne sont pas spécifiques de la LMMC. Ces symptômes sont le plus souvent en rapport avec les anomalies retrouvées sur l'hémogramme :

- Manifestations en rapport avec les cytopénies
 - Anémie : asthénie, dyspnée, pâleur cutanéomuqueuse
 - Thrombopénies : manifestations hémorragiques, purpura
 - Neutropénie : infections, principalement bactériennes
- Syndrome tumoral, reflet de l'hyperleucocytose : altération de l'état général avec perte de poids, sueurs nocturnes, adénopathies, hépatomégalie, splénomégalie
- Manifestations auto-immunes.

La survie médiane est d'environ deux ans et demi. Le risque d'évolution vers une leucémie aiguë est de l'ordre de 25-30% et c'est une des principales causes de décès ²². Quelques rares patients peuvent présenter de manière inaugurale une LMMC acutisée en leucémie aiguë myéloblastique (LAM). Les autres causes de décès sont le plus souvent les infections en lien avec l'immunodépression, qu'elle soit due à la maladie ou aux traitements, et les hémorragies dues aux thrombopénies parfois profondes.

4. Pronostic

L'évolution de la maladie est très variable, avec des patients présentant une maladie stable durant plusieurs années alors que d'autres évoluent en quelques mois vers une LAM. Il est donc primordial de trouver des facteurs pronostiques permettant de classer les patients dans différents groupes pronostiques afin de leur proposer le traitement le plus adapté.

Historiquement, le premier score utilisé dans la LMMC est l'International prognostic scoring system (IPSS) et permet de classer les patients en quatre groupes de risque : faible, intermédiaire 1 et 2, et haut risque ²³. Cependant ce score, de même que l'IPSS révisé ²⁴, a été établi principalement pour les patients porteurs d'un syndrome myélodysplasique et n'est pas adapté à tous les types de LMMC, notamment les formes prolifératives.

En 2013, plusieurs scores spécifiques de la LMMC ont été proposés :

- Celui de la Mayo Clinic, avec comme facteurs de risque un taux élevé de monocytes, une hyperleucocytose, une anémie et une thrombopénie ²⁵,
- Le CPSS (CMML-specific prognostic scoring system), avec comme facteurs de risque retenus la classification FAB et OMS, la dépendance transfusionnelle et la cytogénétique ²⁶,

- Le score pronostique proposé à partir de l'analyse d'une cohorte de patients du Groupe Francophone des Myélodysplasies ¹⁸, la validation ayant été faite sur la cohorte allemande MLL 4. Ce score inclut pour la première fois les mutations génétiques retrouvées dans la LMMC, et retrouve *ASXL1* comme facteur indépendant de survie et de transformation en LAM en analyse multivariée. L'âge, le taux d'hémoglobine, de leucocytes et de plaquettes sont retrouvés comme marqueur pronostic en analyse univariée. Ce score permet de séparer trois groupes distincts de patients atteints de LMMC en termes de survie globale et de survie sans progression. Ce score a récemment été confirmé sur une cohorte de la Mayo Clinic ²⁷.

En 2015, une étude multicentrique regroupant 1832 patients a été réalisée afin de pallier le manque de puissance des études précédentes du fait de faibles effectifs ³. Elle retrouve la mutation d'*ASXL1* comme facteur pronostique indépendant et identifie une nouvelle mutation pronostique, la mutation de *CBL*. Elle propose également un taux de blastes médullaires à 7.5% plutôt qu'à 10% pour différencier la LMMC-1 de la LMMC-2.

5. Traitement

Sur le plan thérapeutique, aucun consensus n'existe actuellement : les différentes options possibles sont envisagées en fonction de l'état général du patient, du type de LMMC, des scores pronostiques et de l'agressivité de la maladie.

L'abstention thérapeutique est la première option en cas de LMMC de type1 sans symptôme clinique, stable sur le plan biologique.

Les soins de support (transfusions d'érythrocytes ou de plaquettes, érythropoïétine, facteurs de croissance leucocytaire) sont proposés de manière systématique, afin de réduire les symptômes en rapport avec les cytopénies.

Un traitement cytoréducteur, comme l'hydroxyurée ²⁸, est à envisager lorsque la LMMC prend une forme proliférative.

Récemment il a été proposé d'utiliser une chimiothérapie par agent déméthylant en cas de maladie évolutive ²⁹, comme l'azacytidine et la décitabine. Ces traitements s'intègrent à l'ADN durant la phase S, et inhibent les DNA méthyltransférases ³⁰⁻³². Malheureusement, moins de la moitié des patients atteints de LMMC répond à ce traitement ^{30,33} et il faut plusieurs mois avant d'en évaluer l'efficacité.

Aucune mutation somatique n'est prédictive de la réponse à ce type de chimiothérapie ²⁹. Un profil moléculaire et transcriptionnel a récemment été décrit pour cibler les patients pour lesquels ce type de traitement serait efficace ³⁰. En effet, il existe un profil épigénétique distinct entre les patients répondeurs et les patients non répondeurs. Chez les répondeurs, les gènes impliqués dans le cycle cellulaire sont activés, améliorant ainsi la mise en contact des drogues avec l'ADN, alors que la résistance aux agents déméthylants est associée à une hyperexpression de CXCL4 et CXCL7, impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la résistance à certaines chimiothérapies ^{34,35}. En Europe, une étude randomisée de phase III vient d'être initiée pour évaluer l'efficacité de la décitabine par rapport à l'hydrée chez des patients atteints de LMMC avec deux critères de sévérité.

Lors du suivi des patients traités par agent déméthylant, la cytométrie de flux montre que les patients répondeurs retrouvent une répartition normale de leurs trois populations monocytaires. Ceci pourrait donc être un marqueur biologique de réponse aux agents déméthylants ¹⁰.

Le seul traitement curatif de la LMMC est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ^{9,36}. Ce traitement est la première option pour les patients jeunes avec facteurs de mauvais pronostic. Cependant, il n'est que rarement réalisé du fait de l'âge avancé des patients atteints de LMMC, et le taux de rechute et de mortalité liée au traitement est plus élevé que pour les autres hémopathies malignes (survie totale de 30 à 40% ³⁷⁻³⁹). Les traitements reçus précédemment à l'allogreffe ont permis d'éradiquer la plus grande partie des cellules tumorales, mais n'ont pas éliminé les cellules les plus mutées, qui sont celles en causes dans les rechutes et sont donc chimiorésistantes.

Plusieurs familles de nouveaux médicaments ont été testées dans la LMMC, jusqu'alors sans grand succès : il s'agit des inhibiteurs de farnesyltransférase ⁴⁰, des inhibiteurs de la voie MEK et des inhibiteurs des histones déacétylases^{33,41-43} . D'autres voies de développement sont envisagées comme les molécules ciblant les inhibiteurs de l'apoptose de la famille Bcl-2 et les inhibiteurs de la signalisation susceptible d'éteindre STAT5 ⁴⁴.

Une récente étude internationale a proposé des critères communs de réponse aux traitements chez les patients atteints de LMMC afin de standardiser les prochains essais cliniques et d'optimiser leurs résultats ⁴⁵. Ces critères de réponse sont visibles en Annexe1.

B. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)

1. Définition

Les cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-Derived Suppressor Cells ou MDSC) forment une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures. Elles ont d'abord été étudiées dans les modèles murins. Une très faible fraction peut se retrouver dans la moelle osseuse ou les organes lymphoïdes secondaires des sujets sains, mais leur accumulation est toujours pathologique et se retrouve principalement dans des modèles de cancers solides comme le carcinome ovarien ⁴⁶, le cancer colo-rectal ⁴⁷, ou en cas d'immunosuppression. La présence et l'accumulation de ces cellules est associée à un mauvais pronostic ^{48,49}.

Chez l'homme, très difficiles à détecter chez les sujets sains, elles s'accumulent dans le sang de patients atteints de tumeur solide (adénocarcinome pancréatique ^{50,51}, carcinome rénal ^{52,53}), en cas de sepsis ou de maladie auto-immune ⁴⁹, par exemple lors des maladies inflammatoires de l'intestin ⁵⁴. Dans les hémopathies malignes, elles ont récemment été identifiées dans le sang de patients atteints de leucémie myéloïde chronique ou de myélome multiple ⁵⁵⁻⁵⁷.

De manière pathologique, ces cellules s'accumulent dans le sang, dans les organes lymphoïdes secondaires et au niveau des tumeurs ^{58,59}.

Le phénotype membranaire des MDSC n'est ni homogène, ni absolument spécifique. Les marqueurs CD33⁺ et CD11b⁺ sont constants ⁴⁹. Les autres marqueurs permettent de distinguer deux sous-types principaux de MDSC:

- le sous-type monocyttaire, défini par les marqueurs membranaires CD14⁺/CD15⁻/HLA-DR⁺,
- le sous-type granulocytaire, défini par le phénotype CD14⁻/CD15⁺/CD24⁺/CD16⁻/HLA-DR⁻.

D'autres sous-types, macrophagiques ou dendritiques, ont récemment été identifiés ⁶⁰.

2. Mécanisme d'action

Les MDSC prolifèrent en réponse à des cytokines sécrétées par les cellules tumorales ou les lymphocytes T, comme le SCF, le M-CSF, le GM-CSF, et à l'interféron γ , à l'Interleukine 4 (IL-4) ou à la cyclo-oxygénase2^{55,56,60,61}. Ces facteurs peuvent inhiber la différenciation et accroître la survie de ces cellules en activant des voies de signalisation impliquant les kinases de la famille Janus-Activated Kinase (JAK) et le facteur de transcription STAT3⁶². Ces facteurs induisent aussi la synthèse, par les MDSC d'origine monocytaire, d'ARGINASE1 ou d'oxyde nitrique (NO) via l'activation de la NO synthase inductible (iNOS) (Schéma 1). Ces deux enzymes - ARGINASE et NOS - ont comme substrat la L-arginine, acide aminé nécessaire aux lymphocytes, et jouent un rôle majeur dans l'immunosuppression des lymphocytes T par les MDSC. La diminution de la L-arginine dans les lymphocytes T CD8⁺ activés aboutit à un défaut de leur prolifération et à leur blocage en phase G0-G1, via la diminution de l'expression de la chaîne CD3 ζ du TCR⁶³.

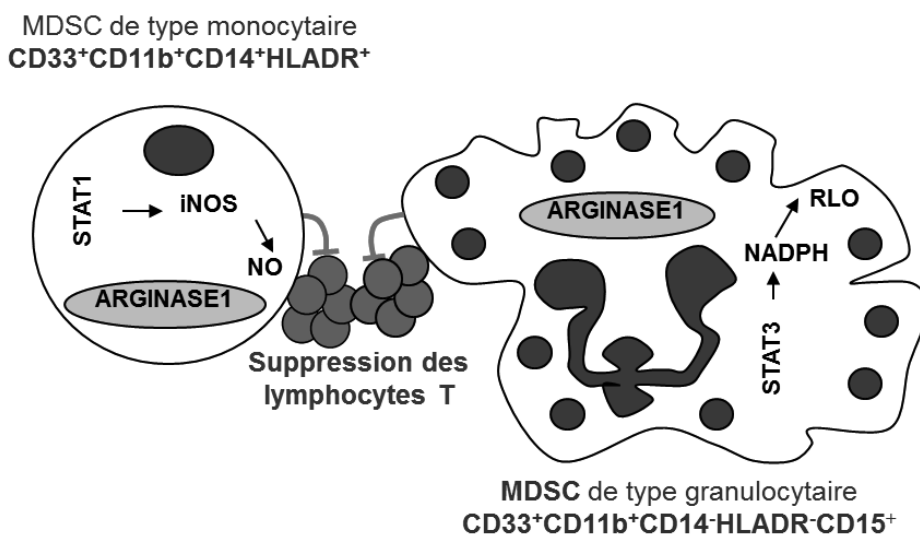


Schéma 1. **Mécanisme d'inhibition des lymphocytes T par les sous-types de MDSC humains.** D'après N. Droin. CD : classe de différenciation ; MDSC : cellule myéloïde suppressive ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxidase ; NO : oxyde nitrique ; iNOS : NO synthase inductible ; RLO : radicaux libres de l'oxygène.

Ces facteurs peuvent également stimuler la production de radicaux libres de l'oxygène (RLO) par les MDSC d'origine granuleuse. Ces RLO entraînent des modifications du CD8 et de la chaîne ζ du CD3, entraînant un dysfonctionnement du TCR et inhibant ainsi la réponse lymphocytaire T spécifique (Schéma 1).

Enfin, la présence de MDSC est habituellement associée à une élimination des lymphocytes T cytotoxiques, mais aussi à une expansion des lymphocytes T régulateurs⁶⁰.

Que ce soit dans les tumeurs solides ou les hémopathies malignes, la présence de MDSC confère généralement à la maladie un pronostic péjoratif, en termes de survie et de réponse au traitement. Ces MDSC sont donc des cibles thérapeutiques potentielles, et des molécules comme le 5-fluorouracil ou les inhibiteurs de la cyclo oxygénase 2 sont actuellement testées chez les patients atteints de cancer solide pour inhiber ces MDSC⁶⁰.

3. Les MDSC dans la LMMC

Sur le plan physiopathologique, on rappelle que la LMMC est définie par une monocytose sanguine, souvent associée à une polynucléose neutrophile en cas de leucocytose. Il y a quelques années, N. Droin et al. a montré que les cellules identifiées cytologiquement comme des monocytes comportaient une fraction variable de cellules granuleuses immatures et dysplasiques, absentes chez les sujets sains du même âge⁶⁴. Ces cellules sont caractérisées par les marqueurs membranaires CD14⁻/CD24⁺/ CD15⁺/ CD16⁻/HLA-DR⁻. Sur le plan moléculaire, ces cellules immatures expriment des taux élevés d'ARN messager codant pour des facteurs de transcription granulocytaire *GFI-1*, *C/EBP ϵ* et *CSF3R*, tandis que les facteurs *PU.1*, *EGR-1*, *EGR-2*, *c-FMS (CSF1R)*, marqueurs de la lignée monocyttaire, sont peu exprimés.

Ces cellules CD14⁻/CD24⁺ synthétisent et sécrètent des quantités importantes d'alpha-défensine 1-3 (HNP1-3), qui inhibent la différenciation macrophagique des monocytes exposés au M-CSF via le récepteur purinergique P2Y6.

Ces cellules dysplasiques ont la propriété de tuer les cellules T autologues activées par un mécanisme impliquant la production de radicaux libres de l'oxygène via l'activation de la NADPH oxydase. Cette immunosuppression dépend d'un contact cellulaire et est inhibée par la N-acétylcystéine (NAC) (Schéma 2).

Ces cellules granuleuses immatures répondent à la définition des cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-Derived Suppressor Cells ou MDSC) décrites ci-dessus. Les analyses génétiques indiquent qu'elles font partie intégrante du clone leucémique de la LMMC.

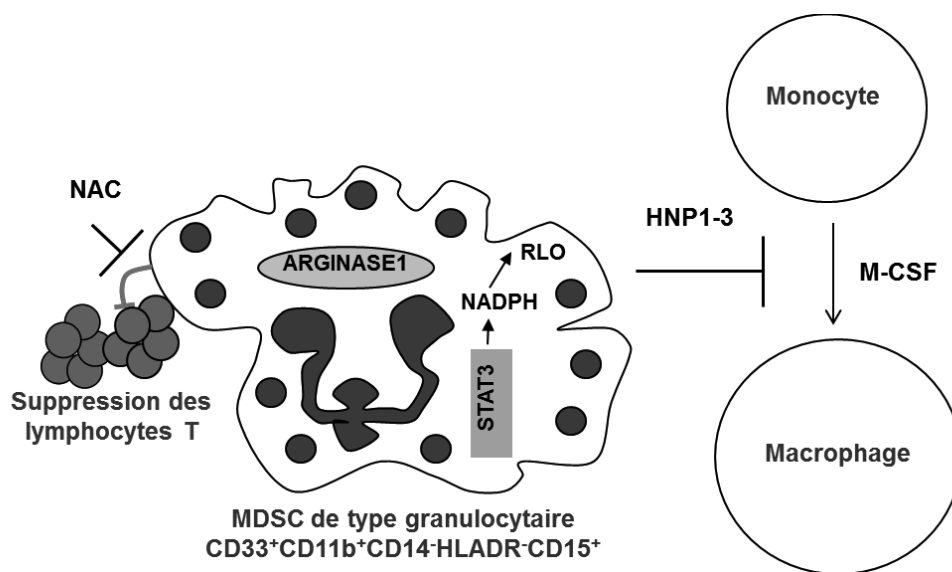


Schéma 2. Mécanisme d'action des MDSC granulocytaires dans la LMMC.

D'après N. Droin. CD : classe de différenciation ; HNP1-3 : alpha-défensine 1-3 ; M-CSF : macrophage colony stimulating factor ; MDSC : cellule myéloïde suppressive ; NAC : N-acétylcystéine ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxidase ; RLO : radicaux libres de l'oxygène.

C. La protéine DOK2

1. La famille des protéines DOK

La protéine DOK2 appartient à la famille des protéines DOK (Downstream Of Kinase) qui est composée de sept membres, DOK1 à DOK7⁶⁵. Ce sont des protéines adaptatrices qui se situent en aval de récepteurs à tyrosine kinase. Elles interagissent avec différents partenaires protéiques au sein de voies de signalisation intracellulaire. Ces protéines partagent des domaines communs sur le plan structurel (schéma 3) :

- Un domaine PH (Plekstrin Homology domain) qui permet le recrutement des protéines DOK à la membrane cellulaire par interaction avec les phospholipides membranaires. Ceci apparaît indispensable pour que ces protéines adaptatrices puissent se lier à leurs partenaires.
- Un domaine PTB (PhosphoTyrosine Binding) qui permet la liaison aux tyrosines phosphorylées.
- Des régions riches en tyrosines phosphorylées, interagissant avec les protéines à domaine SH2 (Src Homology).

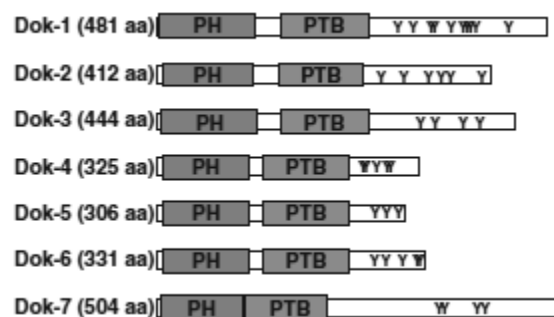


Schéma 3. **La famille des protéines DOK selon Mashima⁶⁵**. Représentation des protéines Dok chez la souris. Y : résidu tyrosine de la région terminale COOH.

Les protéines DOK n'ont pas de domaine catalytique. En se liant à divers partenaires protéiques, elles s'intègrent dans les voies de signalisation intracellulaire en aval des récepteurs à tyrosine kinase de nombreux types cellulaires. Elles se comportent comme des régulateurs négatifs ou positifs de ces voies, selon leur localisation cellulaire ^{66,67}.

L'expression de ces protéines varie en fonction des tissus :

Les protéines DOK1, DOK2 et DOK3 sont exprimées principalement dans les cellules hématopoïétiques. DOK1 est exprimée dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes B et T. DOK2 est exprimée dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes T ⁶⁵, DOK3 n'est pas exprimée dans les cellules lymphoïdes T ⁶⁷.

Les protéines DOK4, DOK5 et DOK6 se retrouvent dans cellules neuronales ^{68,69}. La protéine DOK7 est exprimée dans les cellules cardiaques et les cellules des jonctions neuromusculaires ^{65,70}.

Leur rôle est différent en fonction de leur localisation cellulaire :

Les protéines DOK1, DOK2 et DOK3 agissent essentiellement comme régulateur du système immunitaire et ont été définies à de nombreuses reprises comme potentiels suppresseurs de tumeurs ⁷¹⁻⁷³.

Les protéines DOK4 et DOK5 activeraient les voies de signalisation neuronales et auraient un rôle dans la différenciation des neurones ⁶⁸, comme DOK6 ⁶⁹. DOK7 serait essentiel au niveau de la synapse neuromusculaire par son interaction avec MuSK (muscle specific receptor kinase)⁷⁰.

2. Rôle de *DOK2*

Le gène *Dok2* a été initialement étudié chez le modèle murin, conjointement à *Dok1*⁷²⁷³. En effet, l'inactivation d'un seul des deux gènes n'entraîne pas de phénotype particulier chez la souris alors que l'inactivation simultanée des deux gènes *Dok1* et *Dok2* entraîne des anomalies multiples au cours de l'évolution.

Sur le plan physiopathologique, les protéines DOK1 et DOK2 inhibent les voies de signalisation en aval de récepteurs à tyrosine kinase : récepteurs à l'antigène comme le BCR (B Cell Receptor), le TCR (T Cell Receptor), et récepteurs de cytokines comme le M-CSF ou le GM-CSF. Une fois le récepteur activé, leur domaine riche en tyrosines phosphorylées interagit avec le domaine SH2 de protéines partenaires, en particulier p120RasGAP.

Cet inhibiteur de RAS possède une activité GTPasique et son interaction avec les protéines DOK1 et/ou DOK2 a pour conséquence une inhibition de la voie RAS-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)⁶⁵. Ceci est démontré par l'invalidation simultanée de *Dok1* et *Dok2* chez la souris qui provoque une activation excessive de la voie RAS-MAPK et de la voie PI3K/Akt (Phosphatidylinositol-3-kinase). Les protéines DOK1 et DOK2 interagissent aussi avec d'autres protéines par leur domaine PTB, comme SHIP-1, ABL.

Ainsi elles ont un rôle de régulateur du système immunitaire et inhibent la signalisation du TCR⁷⁴.

Sur le plan clinique, l'inactivation simultanée des deux gènes *Dok1* et *Dok2* chez la souris entraîne des adénocarcinomes pulmonaires précoces⁷⁵, des sarcomes histiocytiques⁷⁶, et des syndromes myéloprolifératifs. Ces gènes peuvent donc être considérés conjointement comme des suppresseurs de tumeur.

Le gène *DOK2*, localisé sur le chromosome 8 (8p21.3), a été récemment étudié seul chez l'homme dans l'adénocarcinome pulmonaire ⁷⁵ et le cancer gastrique ⁷⁷.

Dans l'adénocarcinome pulmonaire, sa sous expression, probablement par un phénomène d'haplo insuffisance, est retrouvée chez un tiers des patients et est associée à un mauvais pronostic. Sa surexpression, à l'inverse, inhibe la prolifération tumorale ⁷⁵. Sa sous expression est également un facteur de mauvais pronostic dans les cancers gastriques, où l'on observe une augmentation des récurrences et une diminution de la survie après résection curative ⁷⁷.

Ainsi le gène *DOK2* seul pourrait être considéré comme un gène suppresseur de tumeur chez l'homme, et ne nécessiterait pas forcément la participation conjointe de *DOK1* comme cela est observé chez la souris.

3. Les protéines DOK et la LMMC

Il existe plusieurs modèles murins générant chez la souris vieillissante une hyperleucocytose (monocytose principalement) induisant une splénomégalie, et reproduisant en partie les caractéristiques de la LMMC humaine ^{20,78}. Parmi ces modèles, la double invalidation des gènes *Dok1* et *Dok2* (*Dok1^{-/-} Dok2^{-/-}*) génère un syndrome myéloprolifératif avec monocytose ^{72,73}. Sur le plan biologique, on observe une prolifération accrue des cellules myéloïdes associée à une diminution de l'apoptose. Au niveau physiopathologique, on constate une activation excessive des voies RAS-MAPKinases et PI3Kinase-Akt.

En analysant ce modèle, notre équipe a observé que les cellules qui s'accumulent avec l'âge sont surtout des cellules granuleuses Ly6G⁺ que des monocytes Ly6C⁺, et que ces cellules granuleuses possèdent des propriétés immunosuppressives pouvant les apparenter à des MDSC. Leur caractère immature est difficile à affirmer chez la souris, mais cette observation a conduit à évoquer l'hypothèse d'une **dérégulation de l'expression des gènes *DOK1* et/ou *DOK2* chez certains patients atteints de LMMC ayant des MDSC.**

D. Prérequis et problématique

Les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire ont mis en évidence plusieurs faits :

1. La présence, dans le sang des patients atteints de LMMC, de MDSC appartenant au clone leucémique. Ces MDSC sont de type granulocytaire car ils expriment CD24, CD15 et n'expriment pas CD14 ni CD16, HLA-DR, VEGFR ou CD16 (Figure 1.A). Elles expriment l'arginase, la MPO et S100A9 (Figure 1.B). Elles exercent une activité immunosuppressive vis-à-vis des lymphocytes T via un contact intercellulaire. Ce mécanisme est RLO dépendant et il est réversible par la N-acétyl-cystéine (Figure 2). Les MDSC inhibent également la différenciation des monocytes en macrophages via la sécrétion d' α -défensines et de HNP1-3 (Schéma 4)⁶⁴.

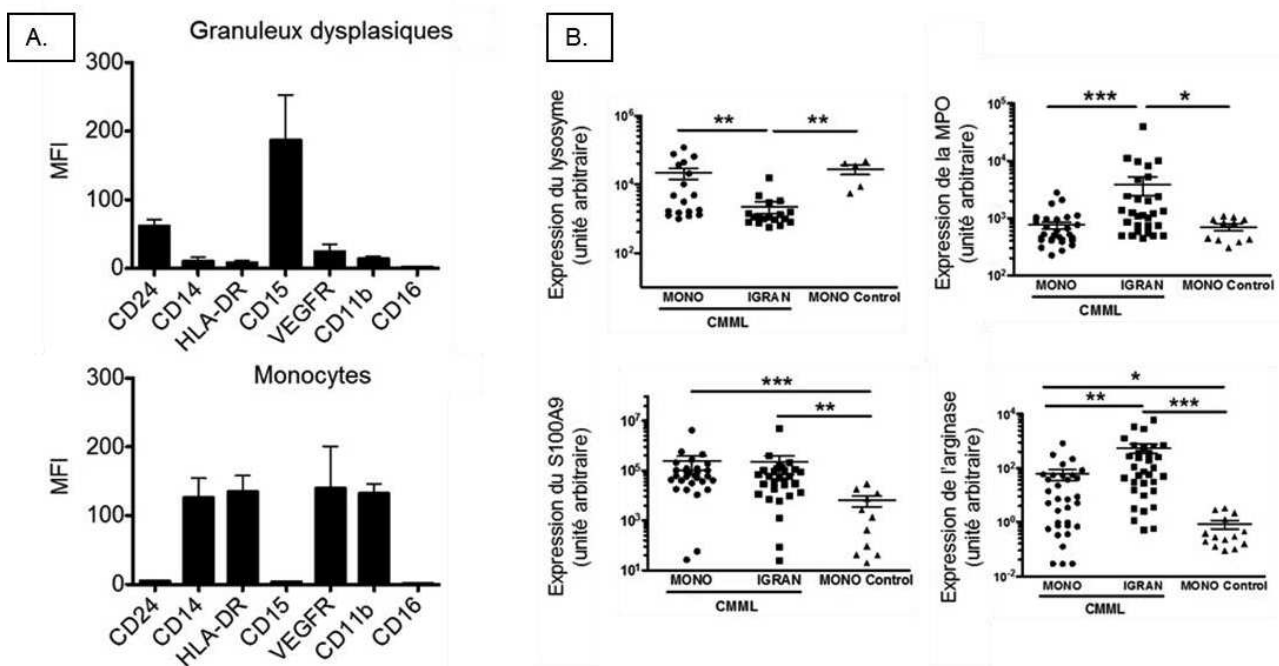


Figure 1. Les MDSC chez les patients atteints de LMMC sont de type granulocytaire.

A. Analyse en cytométrie de flux de l'expression des marqueurs membranaires des cellules dysplasiques et des monocytes chez des patients atteints de LMMC. B. Analyse de l'expression de différentes enzymes et protéines entre les granuleux dysplasiques (IGRAN) et les monocytes (MONO) chez des patients atteints de LMMC. (Données de D. SelimogluBuet et de M-A Raquil)

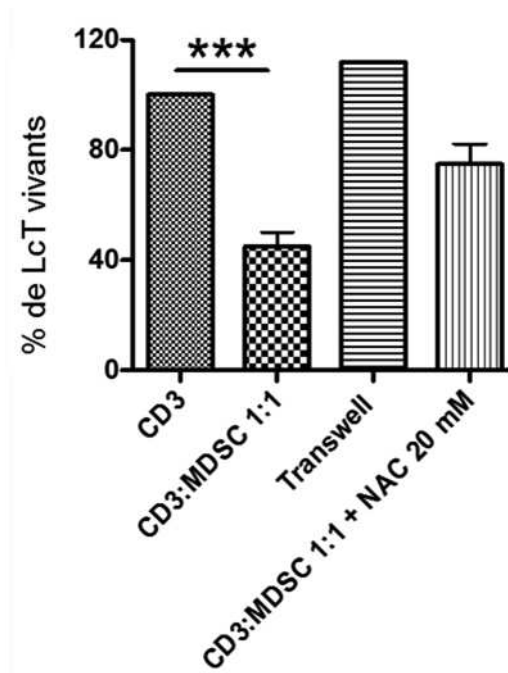


Figure 2. **Les MDSC ont une activité immunosuppressive vis-à-vis des lymphocytes T.** Etude de la viabilité des lymphocytes T CD3⁺ a) seuls, b) au contact de MDSC, c) en présence de MDSC mais sans contact cellulaire, d) au contact de MDSC et en présence de N-acétylcystéine (NAC). (Données de M-A Raquil)

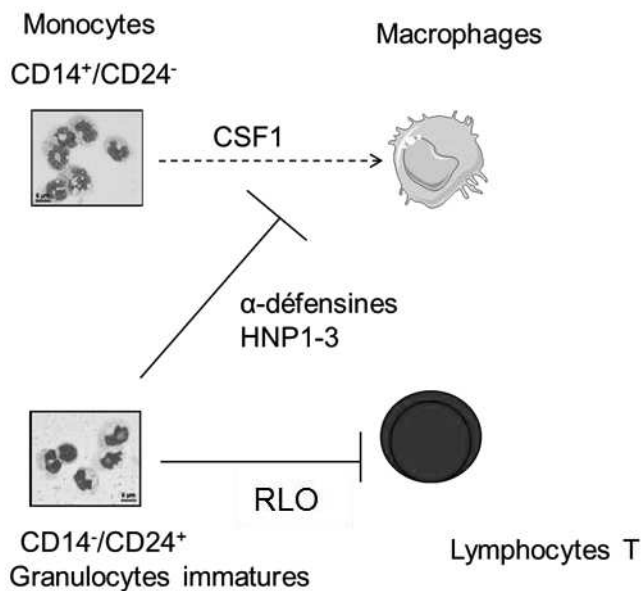


Schéma 4. **Mécanisme d'inhibition de la différenciation macrophagique et des lymphocytes T par les MDSC au cours de la LMMC.** (D'après N. Droin)

2. Dans les modèles murins doublement invalidés pour *Dok1* et *Dok2*, on note une accumulation avec l'âge dans le sang et la rate de cellules myéloïdes Ly6G⁺ (Figures 3 et 4), possédant des propriétés immunosuppressives, les apparentant à des MDSC (Figure 5).

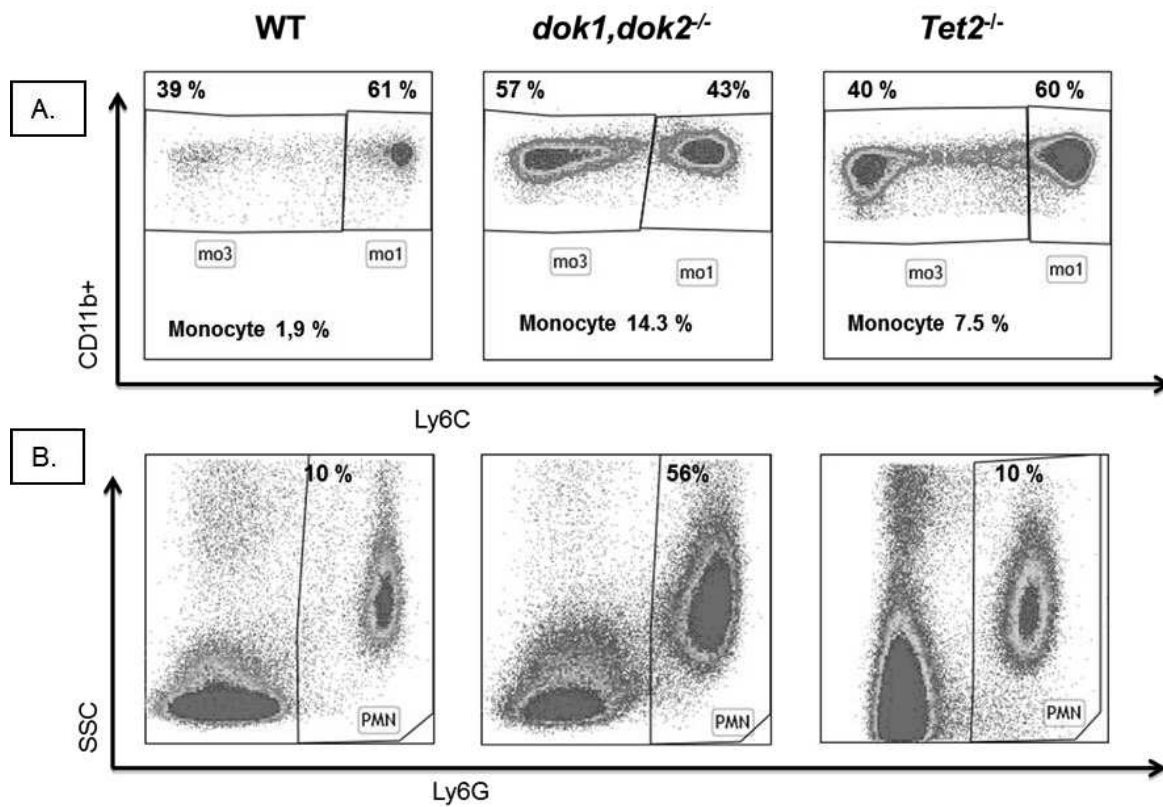


Figure 3. **Les souris *dok1, dok2*^{-/-} âgées accumulent des monocytes et des cellules myéloïdes Ly6G⁺.** A. Accumulation de cellules monocytaires dans les modèles murins *dok1, dok2*^{-/-}, et *Tet2*^{-/-} par rapport au modèle sauvage, à la fois de type MO1 et MO3. B. accumulation de cellules myéloïdes Ly6G⁺ dans le modèle murin *dok1, dok2*^{-/-} par rapport aux deux autres modèles, sauvage et *Tet2*^{-/-}. (Données de D. Selimoglu-Buet et de M-A Raquil)

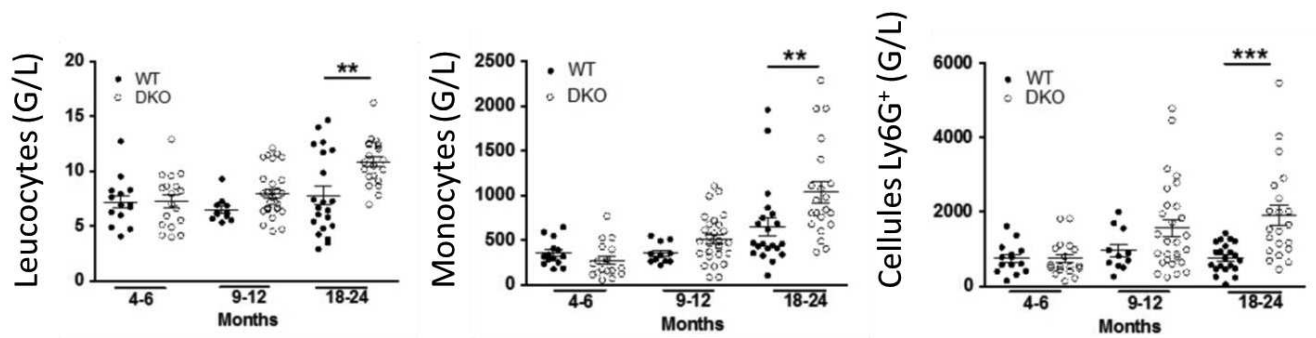


Figure 4. **Evolution du taux de leucocytes, de monocytes et de cellules Ly6G⁺ dans les modèles murins *dok1*, *dok2*^{-/-} (DKO) par rapport au contrôle (WT).** On note une leucocytose, une monocytose et un taux de Ly6G⁺ accru au cours du temps dans le modèle *dok1*, *dok2*^{-/-} par rapport au contrôle. (Données de M-A Raquil)

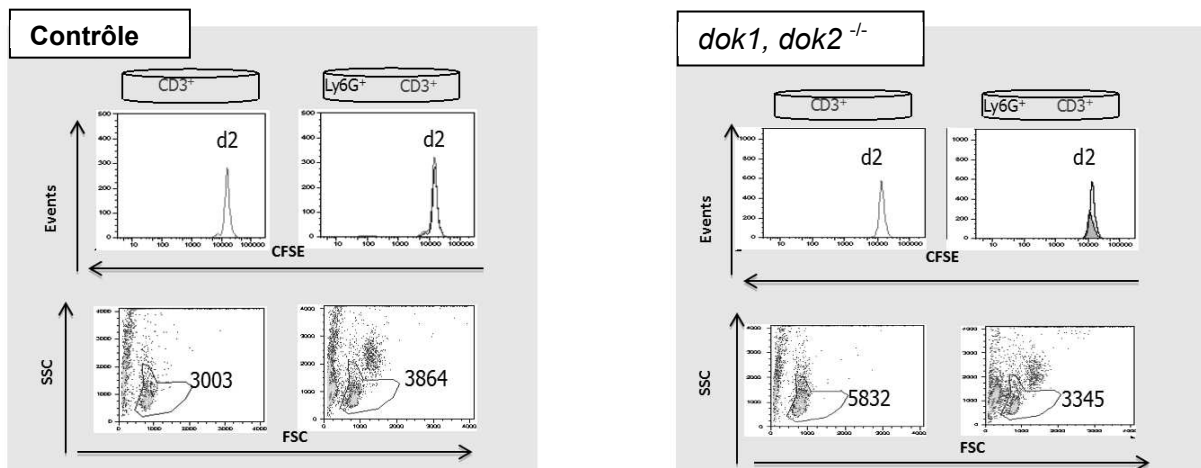


Figure 5. **Les cellules myéloïdes Ly6G⁺ des souris *dok1*, *dok2*^{-/-} ont une activité immunosuppressive.** Etude de la viabilité des lymphocytes T CD3⁺ seuls ou au contact de cellules Ly6G⁺ chez les souris *dok1*, *dok2*^{-/-} par rapport au contrôle. (Données de M-A Raquil)

3. On observe une diminution de l'expression du gène *DOK2* dans les monocytes et les cellules $CD34^+$ de certains patients atteints de LMMC, due à une hyperméthylation du promoteur de ce gène. Cette diminution d'expression n'est pas retrouvée pour le gène *DOK1* (Figure 6).

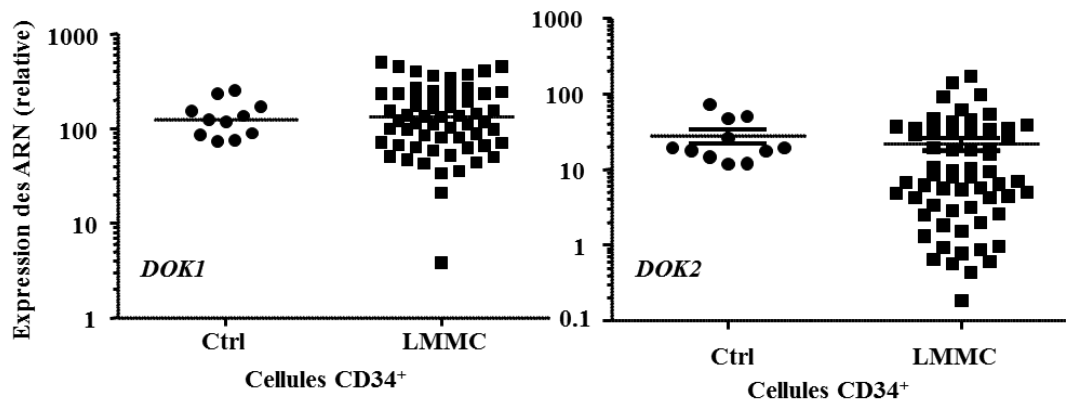


Figure 6. Analyse de l'expression des transcrits *DOK1* et *DOK2* chez des patients atteints de LMMC par rapport à des sujets contrôles du même âge. (Données de N. Droin)

L'hypothèse de travail est la suivante :

La diminution de l'expression du gène *DOK2* dans les cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$ a un impact sur la différenciation granulomonocytaire. Cette diminution d'expression contribue à la génération de cellules granuleuses immatures évoquant des MDSC.

Chez les patients atteints de LMMC, la diminution de l'expression du gène *DOK2* dans les cellules $CD34^+$ pourrait contribuer à une forme proliférative de la maladie et favoriserait la génération de cellules granuleuses immatures évoquant des MDSC, lui conférant un pronostic péjoratif.

II. Matériels et méthodes

A. Culture, infection et différenciation des cellules CD34⁺

Les méthodes de production des shARN, de construction de vecteurs lentiviraux, d'extraction et d'analyse des ARN par RT-qPCR sont décrites en Annexe 2 et 3.

1. Culture cellulaire des cellules CD34⁺

Avant toute infection, la différenciation granulomonocytaire a été étudiée in vitro sur des cellules CD34⁺ humaines récupérées à partir d'unité de sang placentaire (USP) fournies par l'EFS de Créteil. Pour cela, le sang total a été déposé délicatement sur un gradient de densité (1 volume de Ficoll (Biochrom AG[®]) pour 2 volumes de sang). Après centrifugation (20 minutes à 130g, sans frein, à température ambiante) l'anneau contenant les cellules mononuclées (PBMC) a été récupéré à l'interface entre le Ficoll et le plasma. Les PBMC ont été lavées au PBS 1X[®] (centrifugation de 10 minutes, 100g, à température ambiante), et resuspendues dans 50 mL de PBS 1X. Un compte cellulaire a été effectué au bleu trypan sur une lame KOVA slide[®]. Les plaquettes ont alors été éliminées par centrifugation (10 minutes à 90g à température ambiante) et le culot contenant les cellules mononuclées a été récupéré.

Les cellules CD34⁺ ont ensuite été isolées par tri immuno-magnétique : Un culot de 100 millions de cellules a été repris dans 300µL de Running Buffer (Miltenyi Biotec[®]) et incubé (30 minutes à 4°C) avec 50µL de FCR (Fc block receptor, Miltenyi Biotec[®]) et 50µL d'anticorps anti-CD34 humain couplés à des microbilles magnétiques (Miltenyi Biotec[®]).

L'excès d'anticorps a été éliminé par lavage et les cellules CD34⁺ ont été séparées sur trieur immuno-magnétique (Automacs, Miltenyi Biotec[®]). Un compte des cellules CD34⁺ récupérées a été réalisé au bleu trypan sur lame KOVA slide[®].

Les cellules CD34⁺ ont été directement cultivées à 37°C, 5%CO₂, dans un milieu alpha-Mem (Gibco, Invitrogen®) complet auquel a été ajouté un cocktail de cytokines : IL-3 (102 U/mL), FLT3-L (50ng/mL), SCF (50ng/mL), et G-CSF (10ng/mL).

Cette différenciation granuleuse et monocyttaire a duré 21 jours et a été évaluée et validée en microscopie optique (analyse morphologique des cellules), en cytométrie de flux (expression de marqueurs de surface spécifiques aux cellules granuleuses : CD14⁻/CD15⁺, ou monocytaires : CD14⁺/CD15⁻) et en PCR quantitative (analyse en qRT-PCR de l'expression de gènes spécifiques de la lignée granuleuse ou monocyttaire). Figures en Annexe 4 et 5.

2. Infection virale de cellules CD34⁺ entraînant la sous expression de *DOK2*

Une fois l'étape de culture simple validée, les infections ont pu être réalisées. 250 000 cellules CD34⁺ ont été mises en culture dans des puits contenant 500 µL de milieu d'expansion alpha-Mem (Gibco, Invitrogen®) complet auquel a été ajouté un cocktail de cytokines : thrombopoïétine (TPO ; 10ng/mL), interleukine-3 (IL-3 ; 102 U/mL), FLT3-L (50ng/mL), Stem Cell Factor (SCF ; 50ng/mL), et IL-6 (10ng/mL).

Chaque puits représentait une condition étudiée : *shSCR* (contrôle), *shDOK2* (invalidation du gène *DOK2*). Ces cellules ont été ensuite infectées dans le laboratoire L3 par le lentivirus contenant le *shSCR* ou le *shDOK2* associé au Far Red : 5µL de suspension virale a été ajoutée par puits le premier jour, 1 à 5µL le deuxième jour selon l'aspect morphologique des cellules au microscope (signes de toxicité éventuels). Le lendemain, les cellules ont été lavées, sorties du laboratoire L3 et triées au cytomètre de flux (ARIA III ou Influx) afin de récupérer uniquement les cellules positives pour le Far Red, donc infectées par les shARN (Annexe 6).

L'efficacité d'infection des cellules CD34⁺ a été évaluée par analyse en RT-qPCR de l'expression de l'ARNm *DOK2* (méthode décrite en Annexe 3).

3. Différenciation granulomonocytaire des cellules CD34⁺ contrôles et sous exprimant *DOK2*

Les cellules triées pour être infectées à 100% ont été cultivées à 37°C, 5%CO₂, durant quatorze jours dans le milieu de différenciation granulo-monocytaire (alpha-Mem, IL-3, FLT3-L, SCF et G-CSF).

A J4, J7, J11 et J14, ont été réalisés :

- **Un compte cellulaire** en triple exemplaire pour chaque condition d'étude : 10µL de milieu de culture ont été prélevés, dilués au 1/2 dans du bleu trypan et comptés sur une lame Kova slide en microscopie optique.
- **Une étude morphologique au microscope optique**, distinguant les cellules adhérentes et fusiformes (de la lignée monocytaire) des cellules en suspension (appartenant à la lignée granuleuse).
- **Des culots cellulaires** resuspendus dans 700µL de Trizol Reagent (Invitrogen®) sous Sorbonne, pour extraction d'ARN et analyse en RT-qPCR.
- **Une analyse phénotypique en cytométrie de flux** : 5000 cellules ont été prélevées dans chaque puits, resuspendues dans 100µL de PBS 1X, puis incubées pendant 15 minutes à température ambiante avec du Fc Block® dilué au 1/20e.

Après centrifugation, elles ont été reprises dans 200µL de PBS1X-BSA2% et incubées pendant 30 minutes, à 4°C, avec les anticorps dirigés contre des marqueurs membranaires de différenciation couplés à des fluorochromes (tableau ci-dessous) :

Marqueur membranaire de différenciation	Fluorochrome	Fournisseur
CD14	Phycoerythrin-cyanin7 (PC7)	Beckmann Coulter®
CD15	eFluor450	eBioscience®
CD16	Allophycocyanin H7 (APC H7)	BD bioscience®
CD24	Allophycocyanin (APC)	Biolegend®

L'analyse a été faite en utilisant le trieur BD FACS ARIA III, en utilisant des billes contrôles (BD bioscience®) pour le calcul des compensations, et a permis de séparer les cellules monocytaires CD14⁺/CD15⁻ des cellules granulocytaires CD14⁻/CD15⁺. Les données de cytométrie ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

B. Patients atteints de LMMC

1. Recueil de données

Le recueil des données initiales s'est effectué de manière rétrospective, et le suivi des patients a été réalisé de manière prospective.

- Les centres participants sont les suivants : Institut Gustave Roussy (IGR), Hôpital d'Avicenne, Hôpital Cochin, Hôpital Saint Antoine, CHU de Lille, de Toulouse, de Dijon, de Nice, Hôpital de Dresden. Ces centres ont fourni les informations cliniques concernant les patients ainsi que des échantillons de sang total. Les données ont été centralisées à l'IGR.

- Quatre-vingt patients ont été inclus d'avril 2009 à septembre 2013, et le suivi s'est déroulé jusqu'en septembre 2015. Un consentement éclairé a été recueilli. Les critères d'inclusion ont été les suivants : patients majeurs, diagnostic de LMMC définit selon les critères de l'OMS 2008. Les critères d'exclusion étaient la présence d'une autre hémopathie sous-jacente, l'acutisation de la LMMC dès le diagnostic.

- Les caractéristiques recueillies au diagnostic ont été l'âge, le sexe, la numération formule sanguine (NFS), le myélogramme et le caryotype permettant de faire le diagnostic, le sous-type de LMMC, les mutations génétiques, la présence de maladie extra médullaire. Les caractéristiques recueillies le jour de l'analyse de *DOK2* (appelé **jour du point**) ont été la NFS, le caryotype et le myélogramme si réalisés, la présence ou l'absence de maladie extra médullaire, le traitement éventuel de la LMMC. Durant le suivi des patients, l'évolution de la LMMC vers une acutisation ou un décès, ainsi que la date des dernières nouvelles ont été recueillies.

2. Phénotype des cellules mononuclées des patients atteints de LMMC en cytométrie de flux

Les cellules mononuclées (PBMC) issues du sang total des patients ont été récupérées par séparation sur un gradient de densité. Cinq millions ont été resuspendues dans 250µL de PBS1X, puis incubées pendant 15 minutes à température ambiante avec du Fc Block® dilué au 1/20^e. Après centrifugation, elles ont été reprises dans 200µL de PBS1X-BSA2% et incubées pendant 30 minutes, à 4°C, avec les anticorps dirigés contre des marqueurs membranaires de différenciation couplés à des fluorochromes (tableau ci-dessous).

Marqueur membranaire de différenciation	Fluorochrome	Fournisseur
CD45	Krome orange (KO)	BeckmanCoulter®
CD11b	Allophycocyanin-cyanine 7 (APC-Cy7)	BD Pharmingen®
CD14	Phycoerythrin (PE)	BD bioscience®
CD15	eFluor450	eBioscience®
CD16	Alexa fluor 700 (AF 700)	BD bioscience®
CD24	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	BD bioscience®
HLA-DR	Peridinin chlorophyll Protein Complex– Cyanin 5.5 (PercpCy5.5)	BD Pharmingen®

Deux lavages au PBS1X ont été réalisés et les cellules ont été resuspendues dans 250µL de PBS1X-BSA2%. L'analyse a été faite sur le cytomètre LSRII, en utilisant des billes contrôles (BD bioscience®) pour le calcul des compensations. Les données de cytométrie ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

L'analyse en cytométrie de flux a été réalisée selon la démarche suivante (Figure 7) :

1. Les cellules vivantes ont été sélectionnées en fenêtre bi-paramétrique taille (FSC)/ granularité (SSC) afin d'exclure les débris cellulaires
2. Les singulets ont été sélectionnés à l'aide de la fenêtre FSC-A /FSC-W
3. Les cellules exprimant le marqueur pan-leucocytaire CD45 ont été analysées en excluant les lymphocytes.

Les populations leucocytaires ont été identifiées par leur taille (FSC), leur granularité (SSC), et les marqueurs de surface selon le schéma suivant :

- Population monocyttaire (en vert) : SSC intermédiaire et CD11b⁺, CD14⁺, HLA-DR⁺, CD15⁻, CD24⁻, CD16 faible à fort.
- Population granuleuse immature apparentée aux MDSC (en rose) : SSC élevé et CD11b⁺, CD15⁺, CD24⁺, CD14⁻, HLA-DR⁻, CD16⁻.

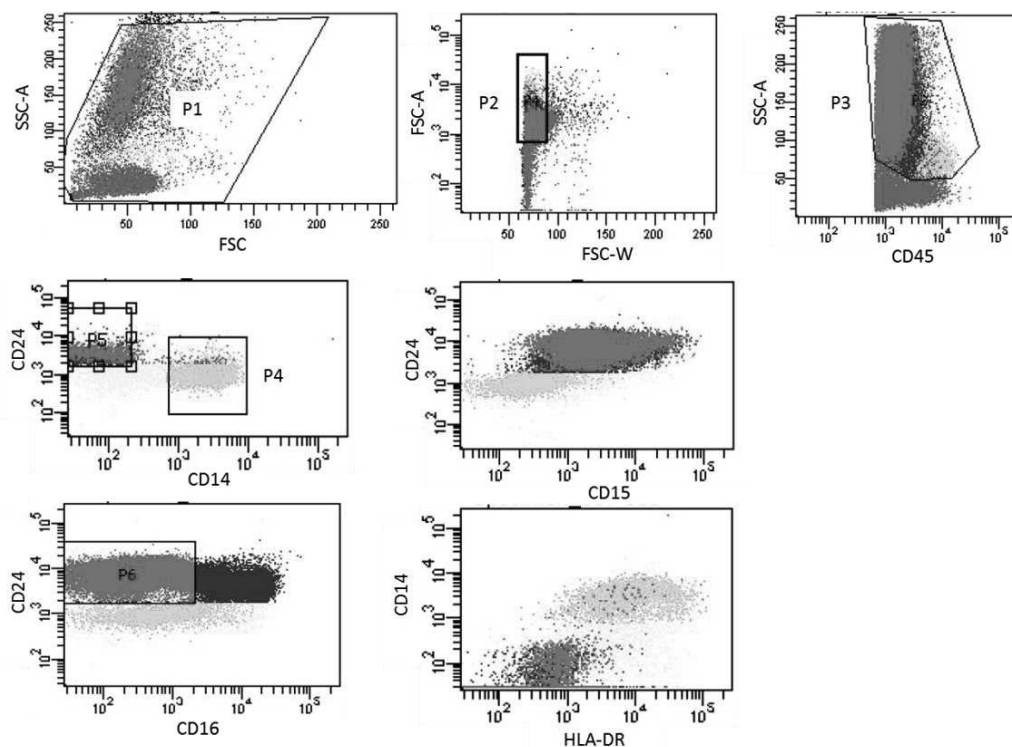


Figure 7. **Analyse en cytométrie de flux des cellules mononucléées du sang périphériques de patients atteints de LMMC.** Fenêtre P1 : cellules vivantes sélectionnées selon la taille (FSC) et granularité (SSC). Fenêtre P2 : singulets sélectionnés à l'aide de la fenêtre FSC-A /FSC-W. Fenêtre P3 : cellules leucocytaires CD45⁺, SSC intermédiaire à élevé. Fenêtre P4 (cellules vertes) : monocytes CD45⁺, CD14⁺, HLA-DR⁺, CD24⁻, CD15⁻, CD16 faible à fort. Fenêtres P5 et P6 (cellules roses) : MDSC CD45⁺, CD24⁺, CD15⁺ CD14⁻, HLA-DR⁻, CD16⁻.

3. Analyse de l'expression du messenger *DOK2* en RT-qPCR dans les cellules CD34⁺ de patients atteints de LMMC

La récupération des cellules CD34⁺ à partir du sang total, l'extraction de l'ARN et l'analyse en RT-qPCR ont été réalisées de la même manière que pour les cellules CD34⁺ issues des USP (décrite en Annexe 3). L'expression relative du taux de transcrit *DOK2* a été calculée en utilisant la méthode comparative des CT.

4. Sujets sains

L'analyse de l'expression de l'ARNm de *DOK2* dans les cellules CD34⁺ a été effectuée chez 23 sujets sains pour établir une valeur normale et une sous expression de ce transcrit. Ceci a été réalisé de la même manière que pour les cellules CD34⁺ issues des patients atteints de LMMC, c'est à dire en RT-qPCR.

C. Statistiques

Toutes les données recueillies ont été colligées dans un classeur Microsoft Excel. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R, du logiciel XLSTAT et du logiciel BiostaTGV.

La comparaison entre les deux groupes des variables quantitatives (caractéristiques biologiques : NFS, taux de MDSC) a été évaluée en utilisant le test de Student ou de Mann-Whitney, celle des variables qualitatives a été réalisée par le test exact de Fisher.

Une valeur de p inférieure à 0.05 a été retenue pour considérer les différences observées comme statistiquement significatives.

Les courbes de survie (survie globale (OS) et survie sans progression vers une LAM (PFS)) ont été réalisées par la méthode de Kaplan-Meier. L'OS est définie comme le temps entre l'analyse de *DOK2* et le décès du patient quelle que soit la cause. La PFS est définie comme le temps entre l'analyse de *DOK2* et le décès ou l'acutisation en LAM. (Pour l'analyse de survie concernant les formes prolifératives ou dysplasiques de LMMC, l'OS est définie par le temps entre le diagnostic et le décès du patient).

Les patients en vie aux dernières nouvelles ou perdus de vue ont été censurés.

Les différences entre les distributions de survie ont été évaluées en utilisant le test du log-rank, et ont été considérées comme significatives quand p était inférieur à 0,05.

Pour calculer la survie en fonction du taux de MDSC, la valeur seuil de 20% a été retenue d'après les données antérieures du laboratoire.

III. Résultats

A. Cellules CD34⁺ infectées par le sh*DOK2* ou le sh*SCR* (contrôle)

1. La sous expression de *DOK2* stimule la prolifération des cellules CD34⁺ humaines et retarde leur différenciation

Un compte des cellules CD34⁺ infectées par le sh*DOK2* ou le sh*SCR* a été effectué en triple exemplaire à J4, J7 et J11 de leur différenciation granulomonocytaire (Figure 8.A). Dès J4, les cellules sous exprimant *DOK2* (cellules sh*DOK2*) ont un avantage prolifératif par rapport aux cellules contrôles. Cette prolifération des cellules sh*DOK2* s'accroît au cours du temps, et se poursuit jusqu'à la fin de la culture, alors que les cellules contrôles ne se multiplient plus depuis J11.

En microscopie optique, on observe dès J4 un avantage prolifératif des cellules sous exprimant *DOK2*, avec une densité cellulaire plus importante que pour les cellules contrôles (Figure 8.B). A J11, les cellules sh*DOK2* ont continué leur prolifération et forment des amas cellulaires du fait d'une densité cellulaire trop importante, alors que les cellules contrôles ont arrêté de se multiplier.

Les photographies de microscopie optique mettent aussi en évidence des différences morphologiques entre les deux conditions. A J4, dans le puits infecté par sh*DOK2* comme dans le puits contrôle, les cellules sont rondes, suggérant leur immaturité.

A J11, les cellules contrôles ont commencé à se différencier, comme en témoigne la présence de cellules fusiformes, adhérentes, correspondant à des macrophages.

A l'inverse, dans le puits des cellules sh*DOK2* on observe très peu de cellules fusiformes et adhérentes, témoignant d'une différenciation retardée.

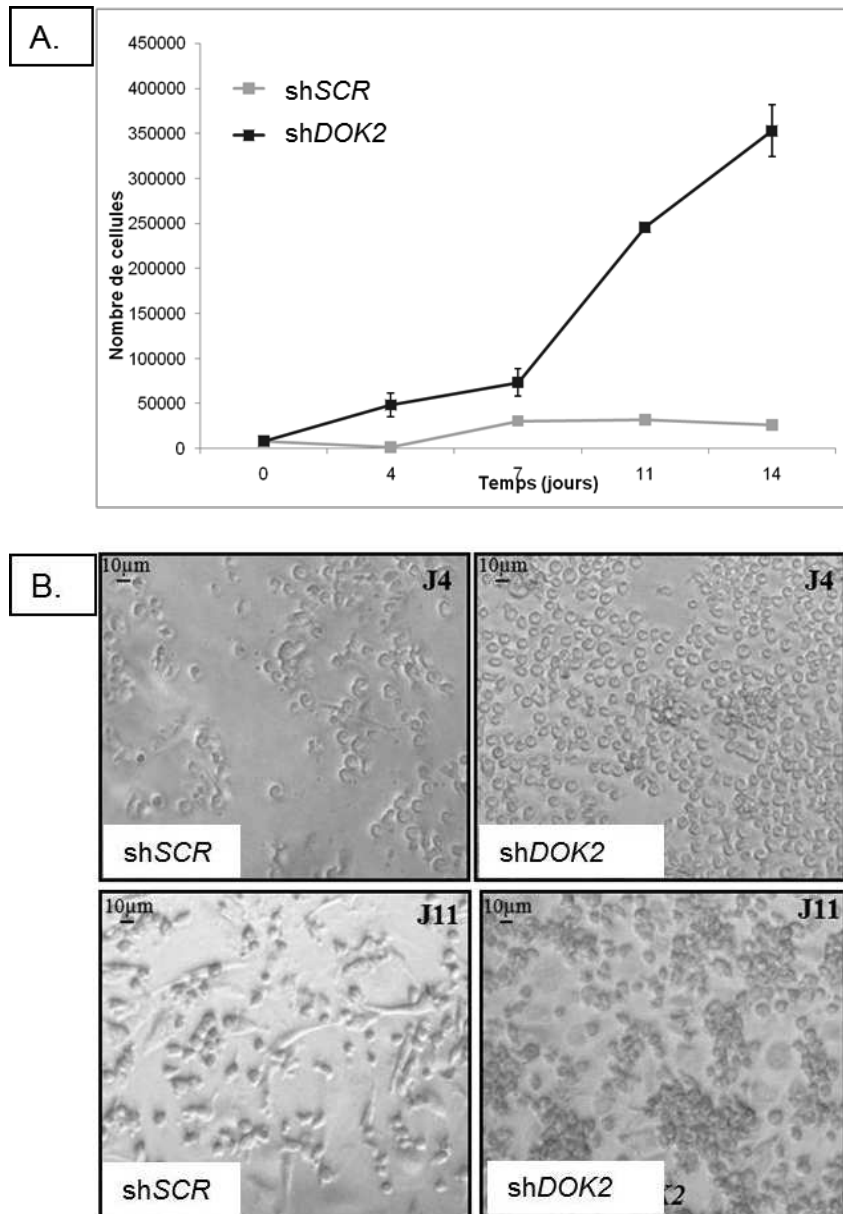


Figure 8. **Etude de la sous-expression ou de *DOK2* au cours de la différenciation granulomonocytaire de cellules $CD34^+$ issues d'unité de sang placentaire.** Les cellules $CD34^+$ ont été isolées par tri immunomagnétique, infectées avec les constructions shSCR ou shDOK2, triées à J0 pour avoir 100% d'infection et cultivées en présence de SCF, IL-3, G-CSF et FLT3-L. (A) Aux temps indiqués, les cellules ont été comptées en triple exemplaire en utilisant du bleu trypan. Une expérience représentative de trois expériences indépendantes est montrée. (B) Photo en microscopie optique des cellules cultivées à J4 et J11. Une photo représentative est montrée par condition.

2. L'analyse des marqueurs membranaires granuleux et monocytaires confirme des anomalies de différenciation dans les cellules CD34⁺ infectées par shDOK2

Une analyse phénotypique a été effectuée au cours de la différenciation granulomonocytaire en cytométrie de flux. Les cellules vivantes ont été sélectionnées en fenêtre bi-paramétrique taille / granulosité pour exclure les débris cellulaires.

Les histogrammes présentés en Figure 9 représentent l'acquisition des marqueurs membranaires monocytaires (CD14) et granulo-cytaire (CD15).

On observe pour les cellules contrôles, en gris, une répartition égale des lignées monocytaires (CD14⁺/CD15⁻) et granulo-cytaire (CD14⁻/CD15⁺). En ce qui concerne les cellules sous exprimant *DOK2*, en noir, on observe une diminution de la fraction monocytaires au profit de la fraction granulo-cytaire. Ainsi, la diminution de l'expression de *DOK2* induit un biais de différenciation au profit de la lignée granulo-cytaire.

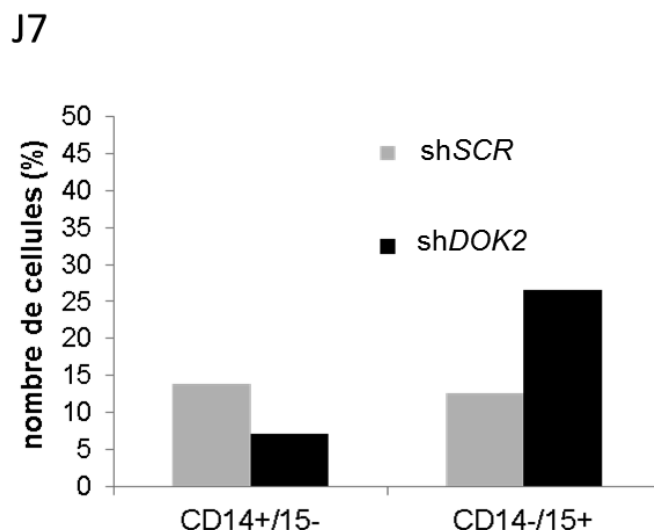


Figure 9. **La diminution de l'expression de *DOK2* induit un biais de différenciation au profit de la lignée granulo-cytaire.** Analyse en cytométrie de flux de la sous-expression de *DOK2* au cours de la différenciation granulomonocytaire de cellules CD34⁺. Une expérience représentative est montrée. CD15⁺ : marqueur granuleux ; CD14⁺ marqueur monocytaires.

B. Patients atteints de LMMC

1. Caractéristiques de la population

Quatre-vingt patients ont été inclus d'avril 2009 à septembre 2013, et le suivi s'est déroulé jusqu'en septembre 2015. Les caractéristiques épidémiologiques des patients sont détaillées dans le Tableau 1. L'âge médian au diagnostic était de 77 ans. Les hommes étaient majoritaires dans la cohorte (61%) avec un sexe ratio à 1.6. 80% des patients présentaient une LMMC de type 1, et 76% avaient un risque cytogénétique faible. La maladie avait une localisation extramédullaire dans un quart des cas. Le suivi médian des patients a été de 20 mois, au cours desquels 11% des patients ont présentés une acutisation et 30% sont décédés.

Caractéristiques	Nombre de patients = 80
Age au point, années	
Médiane	78
Moyenne	75
Rang	51-91
Age au diagnostic, années	
Médiane	77
Moyenne	74
Rang	47-91
Sexe	n=80, (%)
Homme	49 (61.2)
Femme	31 (38.8)
Sexe ratio	1,6
Evolution	n=80, (%)
≤ 6 mois	33 (41.2)
> 6 mois	47 (58.8)
Diagnostic OMS	n=80, (%)
LMMC-1	64 (80)
LMMC-2	16 (20)

Caractéristiques	Nombre de patients = 80
Risque cytogénétique	n=79, (%)
Faible	61 (77.2)
Intermédiaire	11 (13.9)
Elevé	7 (8.9)
Mutation génétique	n=78 (%)
<i>TET2</i>	43 (55)
<i>ASXL1</i>	27 (35)
<i>SRSF2</i>	27 (35)
Maladie extra-médullaire	n=80, (%)
Présente	20 (25)
Absente	60 (75)
Traitement avant évaluation de <i>DOK2</i>	n=80, (%)
Abstention thérapeutique / Soins de support	61 (76.2)
Hydroxyurée	8 (10)
Autres	11 (13.8)
Suivi, mois	
Médiane	20
Rang	2-47
Evolution	n, (%)
Décès	24/80 (30)
Transformation en LA	7/63 (11)

Tableau1. **Caractéristiques épidémiologiques de la cohorte de 80 patients atteints de LMMC.**

2. Valeur normale de l'expression du transcrit *DOK2*

La valeur normale de l'expression de *DOK2* a été définie par rapport à une population saine, du même âge que les patients atteints de LMMC. La distribution de *DOK2* étant normale selon la loi de Shapiro Wilk, on a ainsi pu définir sa moyenne, sa médiane et ses quartiles (Tableau 2). La sous expression du transcrit *DOK2* est alors définie par une valeur inférieure au premier quartile.

Expression du transcrit <i>DOK2</i> chez 23 sujets sains : distribution normale	
Moyenne	36,045
Médiane	23,256
Premier quartile	15,344

Tableau 2. **Analyse en RT-qPCR du transcrit *DOK2* chez 23 sujets sains.** Les valeurs de *DOK2* suivent une distribution normale selon la loi de Shapiro Wilk.

Ainsi, deux groupes de patients se distinguent au sein de la cohorte en fonction de l'expression du transcrit *DOK2* (Figure 10) : le groupe 1 sous exprimant ce gène, et le groupe 2 l'exprimant normalement.

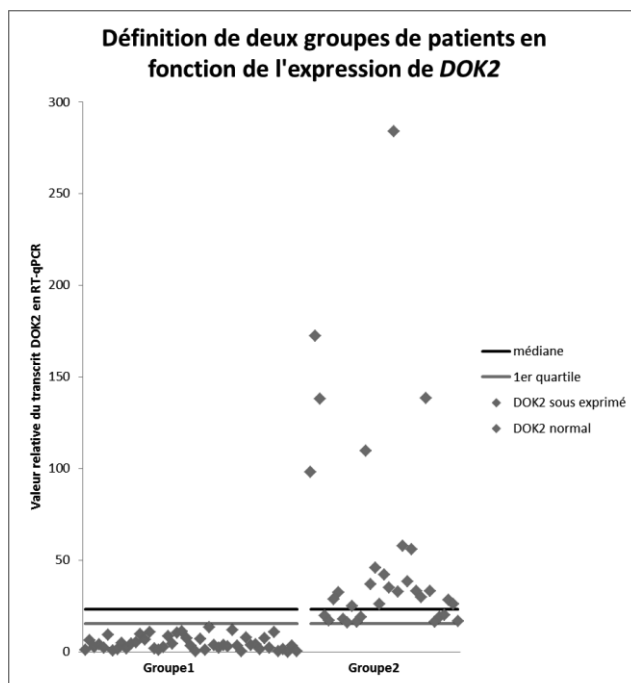


Figure 10. **La cohorte de 80 patients se répartit en deux groupes en fonction de l'expression du transcrit *DOK2*.** Chaque losange représente un patient. La médiane (en noir) ainsi que le premier quartile (en rouge) sont ceux de la population saine du même âge regroupant 23 sujets.

Les caractéristiques épidémiologiques de ces deux groupes sont détaillées dans le Tableau 3. Ces deux groupes sont comparables, ainsi l'âge au diagnostic, le sexe ratio, ou encore le pourcentage de LMMC de type 1 ne diffèrent pas statistiquement entre les deux groupes.

Caractéristiques	Groupe1 n=47, (%)	Groupe2 n=33, (%)	Valeur de p
Age au point, années			
Médiane	78	79	p=0.36
Moyenne	75	77	
Rang	51-91	51-90	
Age au diagnostic, années			
Médiane	77	76	p=0.459
Moyenne	73	75	
Rang	50-91	47-88	
Sexe			
Homme	27 (57)	22 (67)	p=0.487
Femme	20 (43)	11 (33)	
Sexe ratio	1,4	2	
Diagnostic OMS			
LMMC-1	38 (81)	26 (79)	p=1
LMMC-2	9 (19)	7 (21)	
Risque cytogénétique			
Faible	37(79)	24 (73)	p=0.533
Intermédiaire	7 (15)	4 (12)	
Elevé	3 (6)	4 (12)	
Non disponible	0 (0%)	1 (3)	
Mutation génétique			
<i>TET2</i>	24 (51)	19 (57)	p=0.776
<i>ASXL1</i>	17 (38)	10 (30)	
<i>SRSF2</i>	17 (38)	10(30)	
Maladie extra-médullaire			
Présente	12 (26)	8 (24)	p=1
Absente	35 (74)	25 (76)	
Traitement avant inclusion			
Abstention thérapeutique/Soins de support	38 (81)	23 (70)	p=0.392
Hydroxyurée	3 (6)	5 (15)	
Autres	6 (13)	5 (15)	

Tableau 3. **Caractéristiques épidémiologiques des deux groupes de patients définis par l'expression du transcrit *DOK2***. La comparaison entre les deux groupes des variables quantitatives a été évaluée en utilisant le test de Student, celle des variables qualitatives a été réalisée par le test exact de Fisher.

C. Conséquences de la sous expression de *DOK2* sur les caractéristiques de la LMMC

1. La sous expression de *DOK2* est associée à une forme proliférative de la LMMC

Le taux de leucocytes est statistiquement plus élevé chez les patients sous exprimant *DOK2* (groupe 1) par rapport aux patients ayant une expression normale de *DOK2* (groupe 2), que ce soit au diagnostic de la LMMC (19.5 Giga/L et 8.7 Giga/L respectivement, $p=1.5 \times 10^{-4}$), ou le jour du point (19.8 Giga/L et 12.2 Giga/L respectivement, $p=0.0093$) (Figures 11 et 12).

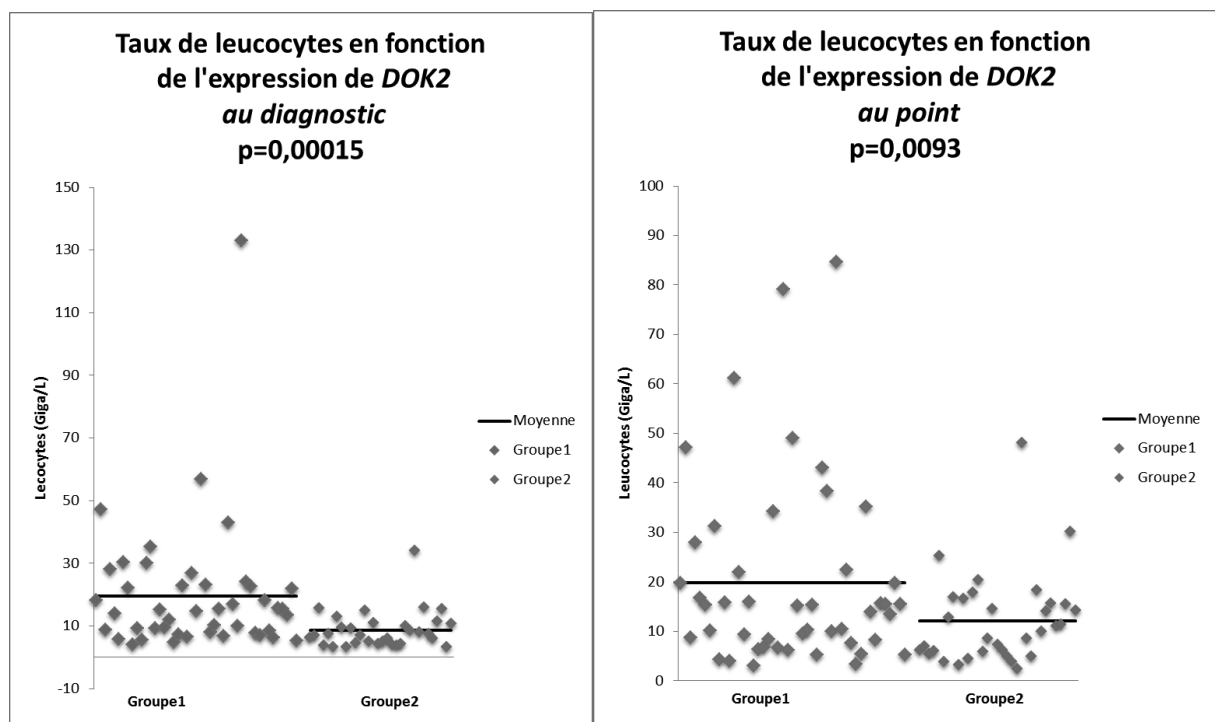


Figure 11. Taux de leucocytes chez 77 des 80 patients de la cohorte en fonction de l'expression du transcrit *DOK2*. Les patients sont répartis en groupe 1 (patients sous exprimant *DOK2*) et groupe 2 (patients ayant une expression normale de *DOK2*). Chaque losange représente un patient. La moyenne du taux de leucocytes pour chaque groupe est représentée en noir. Le point correspond au jour où le transcrit *DOK2* a été dosé.

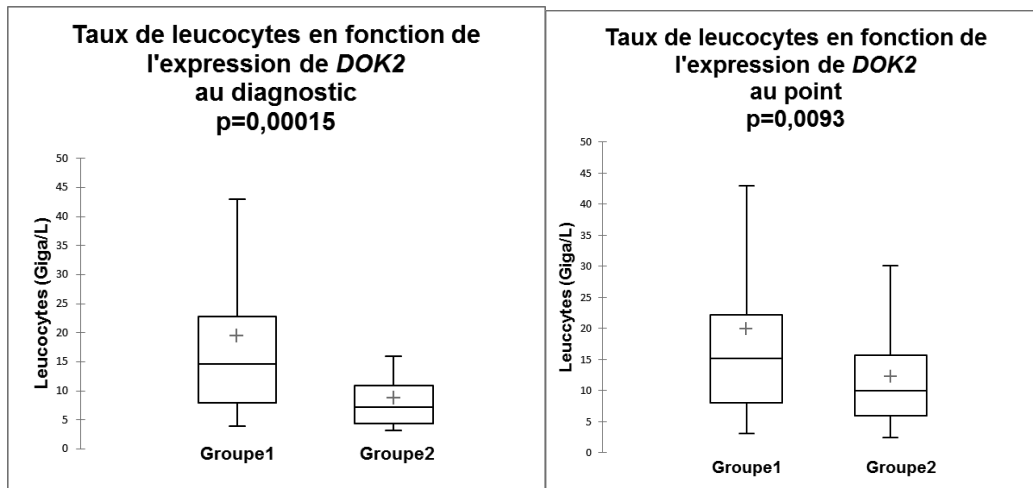


Figure 12. **Analyse du taux de leucocytes en fonction de l'expression de *DOK2*** : sous expression (groupe 1) et expression normale du gène (groupe2). Les croix rouges représentent la moyenne, les rectangles les quartiles 1 à 3 coupés par la médiane.

Le taux de polynucléaires neutrophiles est statistiquement plus élevé chez les patients sous exprimant *DOK2* (groupe 1) par rapport aux patients ayant une expression normale de *DOK2* (groupe 2), au diagnostic de la LMMC (10.6 Giga/L et 4.2 Giga/L respectivement, $p=3.8 \times 10^{-5}$), ou le jour du point (10.9 Giga/L et 5.6 Giga/L respectivement, $p=0.009$, Figures 13 et 14).

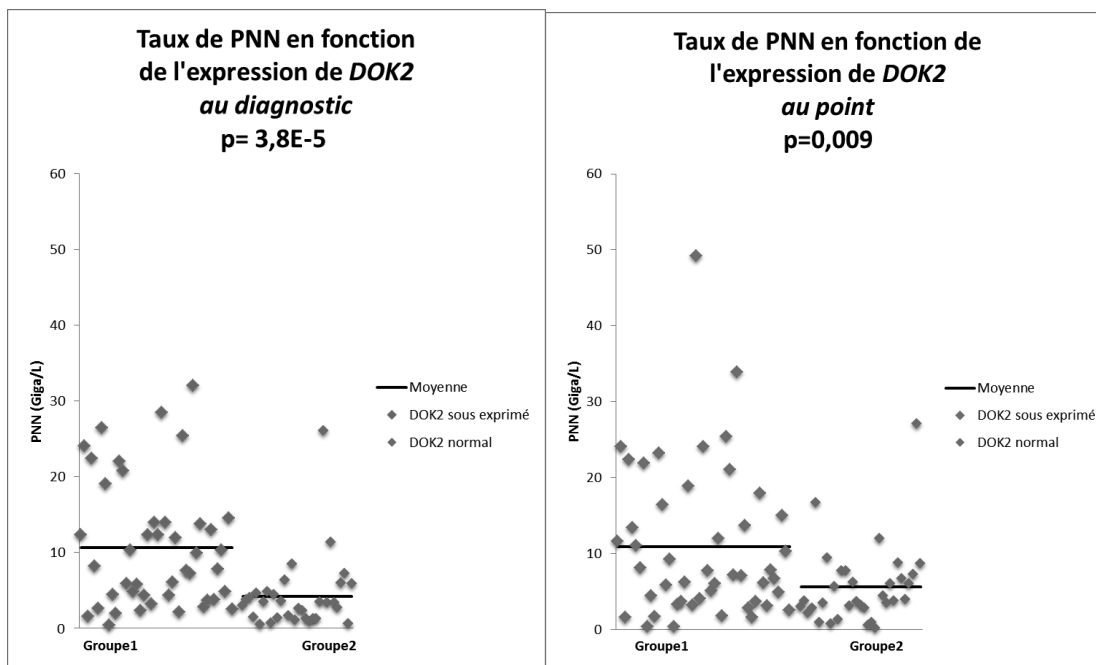


Figure 13. **Taux de polynucléaires neutrophiles chez 76 des 80 patients de la cohorte en fonction de l'expression du transcrit *DOK2***. Les patients sont répartis en groupe 1 (patients sous exprimant *DOK2*) et groupe 2 (patients ayant une expression normale de *DOK2*). Chaque losange représente un patient. La moyenne du taux de polynucléaires neutrophiles pour chaque groupe est représentée en noir.

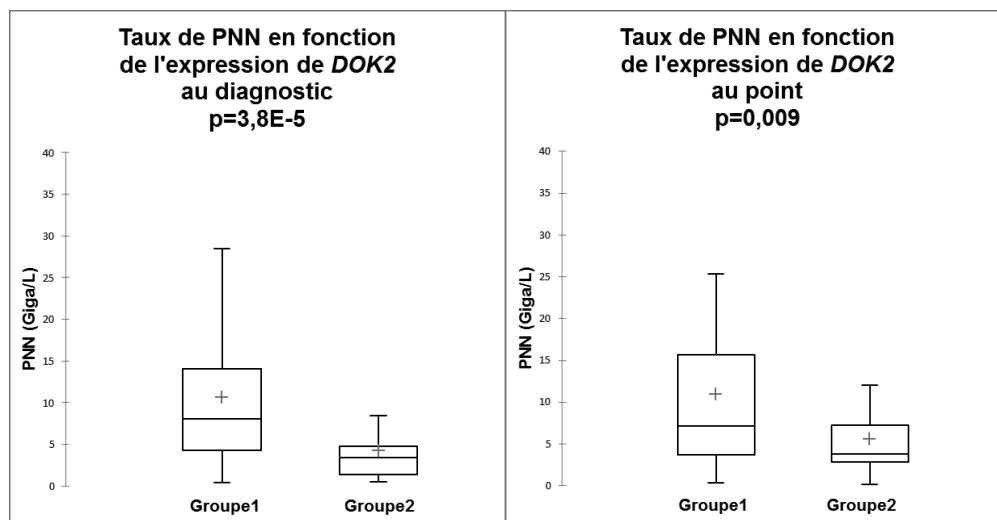


Figure 14. **Analyse du taux de PNN en fonction de l'expression de *DOK2*** : sous expression (groupe 1) et expression normale du gène (groupe2). Les croix rouges représentent la moyenne, les rectangles les quartiles 1 à 3 coupés par la médiane.

En ce qui concerne le taux de monocytes, il est statistiquement plus élevé chez les patients du groupe 1 par rapport aux patients du groupe 2 au moment du diagnostic de la LMMC.

(4.9 Giga/L et 2.6 Giga/L respectivement, $p=0.03$). En revanche le taux de monocytes n'est pas statistiquement plus élevé le jour du point (4.7 Giga/L et 3.8 Giga/L respectivement, $p=0.9$) (Figure 15).

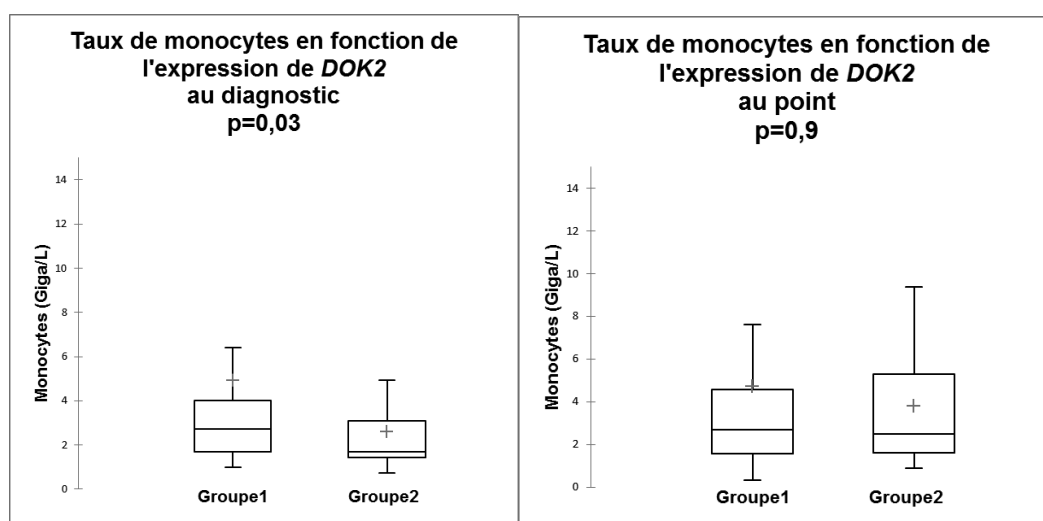


Figure 15. **Analyse du taux de monocytes chez 77 des 80 patients de la cohorte en fonction de l'expression du transcrite *DOK2***. Les patients sont répartis en groupe 1 (patients sous exprimant *DOK2*) et groupe 2 (patients ayant une expression normale de *DOK2*). Les croix rouges représentent la moyenne, les rectangles les quartiles 1 à 3 coupés par la médiane.

2. La sous expression de *DOK2* est associée à un taux de MDSC plus important

L'analyse en cytométrie de flux a mis en évidence un pourcentage de MDSC statistiquement plus élevé chez les patients du groupe 1 par rapport aux patients du groupe 2 (26.6% et 9.2%, respectivement, $p=0.017$, Figure 16).

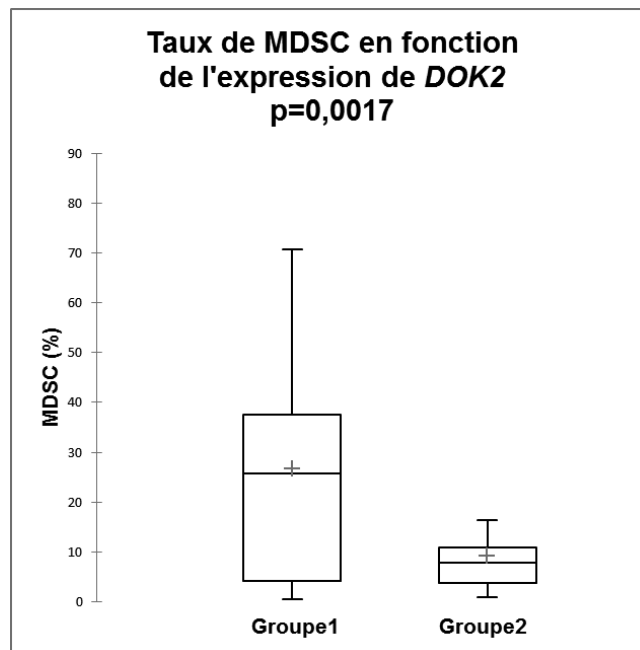


Figure 16. **Analyse en cytométrie de flux du taux de MDSC chez 43 patients en fonction de l'expression du transcrit *DOK2*.** Les patients sont répartis en groupe 1 (patients sous exprimant *DOK2*) et groupe 2 (patients ayant une expression normale de *DOK2*).

Si l'on s'intéresse au ratio MDSC/Monocytes calculé à partir de l'analyse en cytométrie de flux, il y a statistiquement plus de MDSC que de monocytes dans le groupe 1 que dans le groupe 2 (ratio à 1.49 dans le groupe 1 contre 0.46 dans le groupe 2, $p=0.018$, Figure 17).

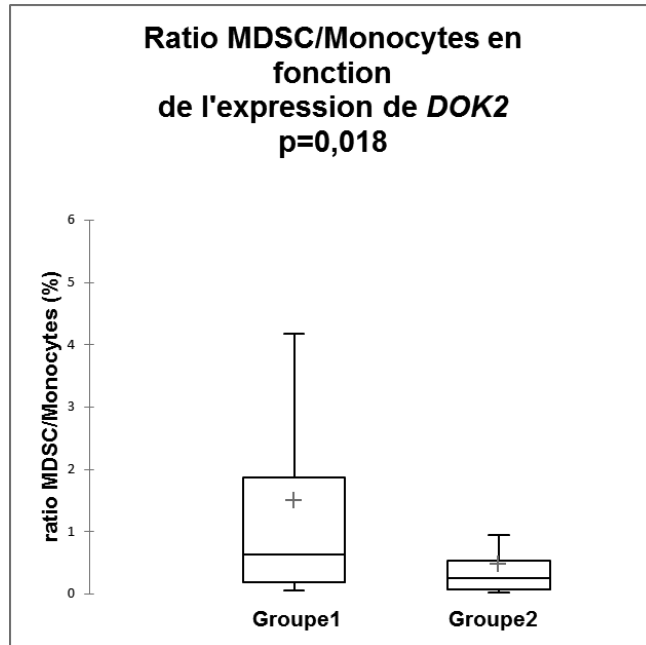


Figure 17. Analyse en cytométrie de flux du ratio MDSC/monocytes chez 43 patients en fonction de l'expression du transcrit *DOK2*. Les patients sont répartis en groupe 1 (patients sous exprimant *DOK2*) et groupe 2 (patients ayant une expression normale de *DOK2*).

3. Analyse des autres paramètres de la NFS en fonction de *DOK2*

Il n'existe pas de différence statistiquement significative du taux d'hémoglobine, de plaquettes ou de lymphocytes entre les deux groupes ($p=0.642$, $p=0.08$ et $p=0.499$, respectivement) (Figure 18).

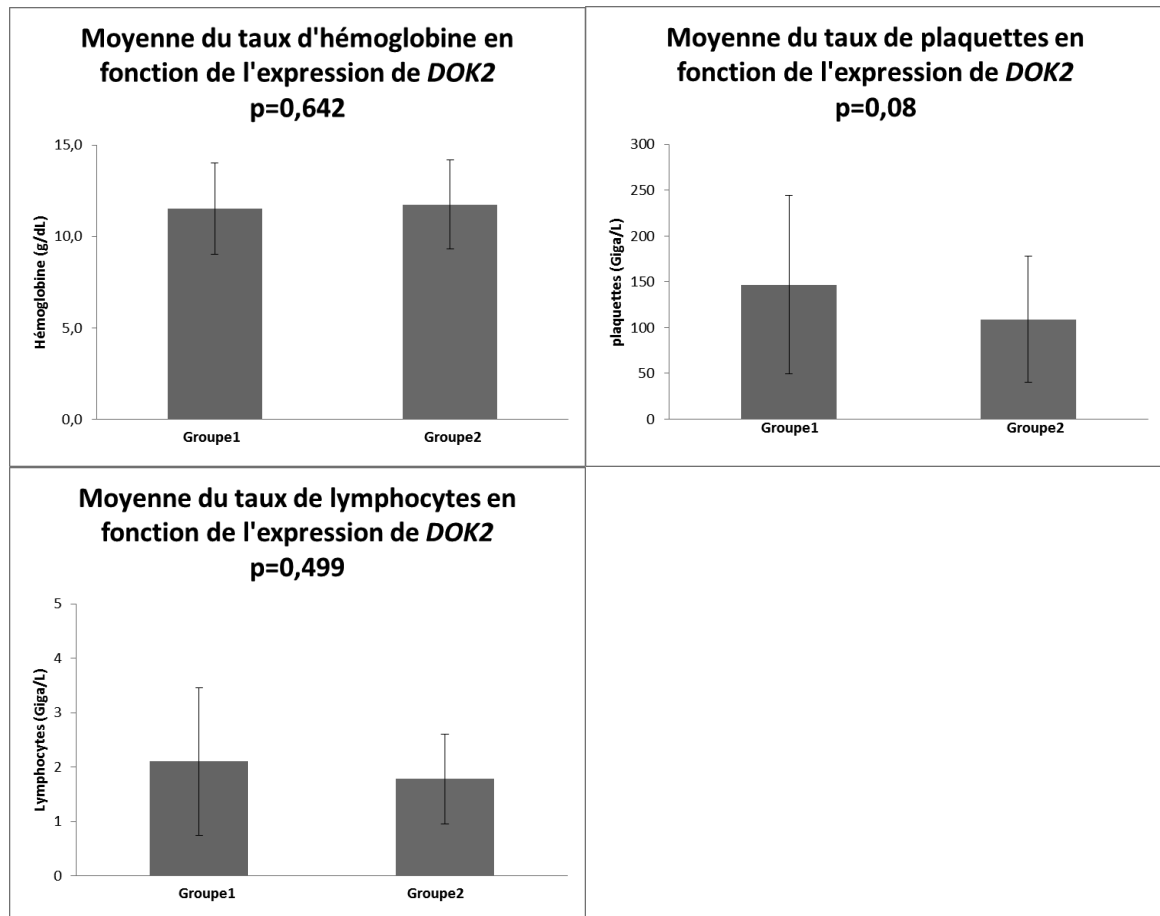


Figure 18. **Moyenne du taux d'hémoglobine, de plaquettes et de lymphocytes en fonction de l'expression du transcrit *DOK2* chez 79 patients.** Les patients sont répartis en groupe 1 (patients sous exprimant *DOK2*) et groupe 2 (patients ayant une expression normale de *DOK2*). Les écarts type sont représentés.

D. Expression de *DOK2*, MDSC, prolifération et survie

La survie a été étudiée chez 77 des 80 patients de la cohorte. Il n'y a pas de différence en termes de survie entre les 2 groupes, que ce soit en survie globale ($p=0.818$) ou en survie sans transformation en leucémie aiguë ($p=0.738$) (Figures 19 et 20).

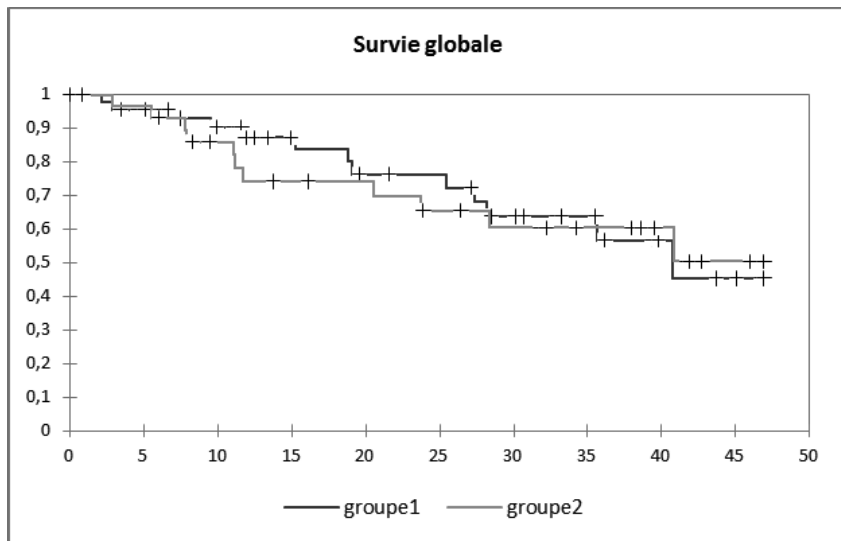


Figure 19. Courbe de **survie globale** pour les patients du groupe 1 (courbe bleue) et les patients du groupe 2 (courbe verte).

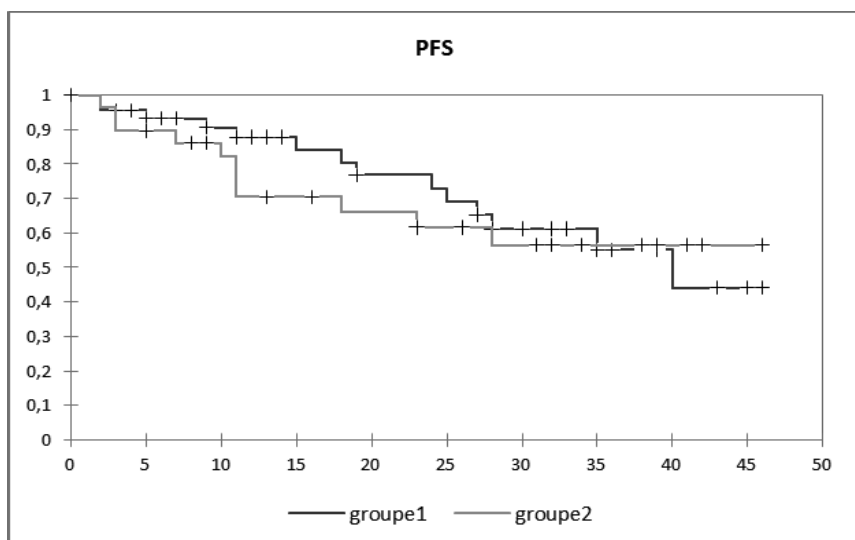


Figure 20. Courbe de **survie sans acutisation** pour les patients du groupe 1 (courbe bleue) et les patients du groupe 2 (courbe verte).

Il existe par contre une différence de survie entre les patients présentant plus de 20% de MDSC par rapport aux patients dont la valeur de MDSC est inférieure à 20% ($p=0.038$, Figure 21). (La valeur seuil de 20% a été retenue d'après les données antérieures du laboratoire).

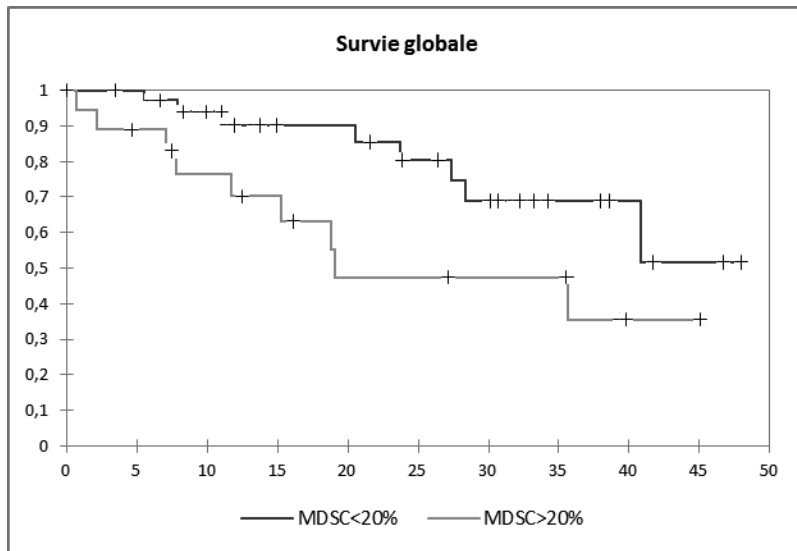


Figure 21. Courbe de **survie globale** pour les patients avec MDSC >20% (courbe verte) et les patients avec MDSC <20% (courbe bleue)

Il n'y a pas de différence significative en termes de survie entre les formes prolifératives et les formes dysplasiques de LMMC ($p=0.094$, Figure 22), même si l'on observe une forte tendance pour une survie diminuée en cas de maladie proliférative.

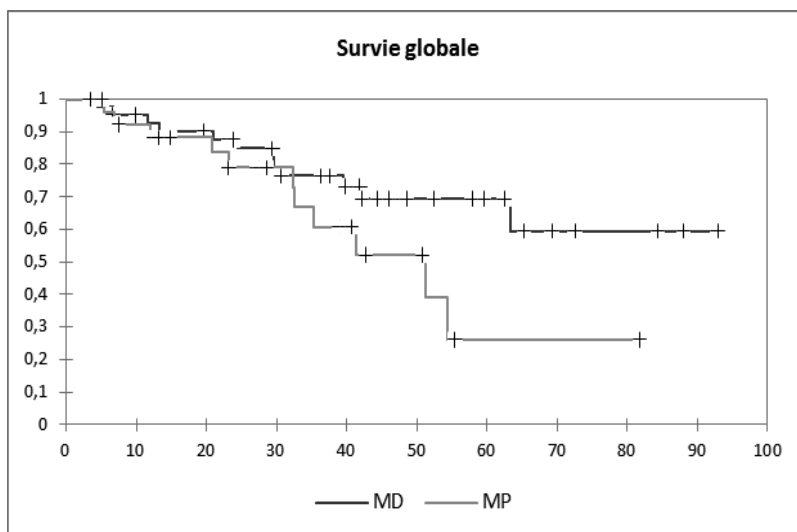


Figure 22. Courbe de **survie globale** pour les patients avec une forme dysplasique (courbe bleue) et les patients avec une forme proliférative de LMMC (courbe verte).

IV. Discussion

Notre travail portant sur une cohorte de 80 patients atteints de LMMC démontre que le niveau d'expression du transcrit *DOK2* dans les cellules CD34⁺ de patients permet d'identifier 2 groupes de LMMC : celui dans lesquelles il existe une diminution de l'expression de *DOK2* (groupe1) et celui exprimant normalement *DOK2* (groupe2). Le groupe de patients sous exprimant *DOK2* présente une forme proliférative de LMMC avec hyperleucocytose, augmentation des PNN et, dans une moindre mesure, des monocytes. Il est associé à un pourcentage de MDSC plus important. La survie globale et la survie sans transformation ne diffèrent pas entre les deux groupes. En revanche, la survie globale est diminuée lorsque les patients ont un taux de MDSC qui dépasse 20% en cytométrie de flux. La forme proliférative de la LMMC ainsi que la présence de MDSC dans le groupe 1 en font une maladie avec un pronostic péjoratif.

La cohorte que nous avons étudiée est comparable aux données de la littérature, hormis l'âge des patients au diagnostic qui est un peu plus élevé. Dans une étude internationale récente, Padron et al. ³ analyse les caractéristiques de 1832 patients atteints de LMMC. L'âge médian des patients est de 70 ans dans l'étude internationale contre 77 ans dans notre cohorte ; le pourcentage d'hommes (67% et 61%, respectivement) et de LMMC de type 1 (80% et 80%, respectivement) sont similaires. La présence d'une maladie extra-médullaire est observée dans un quart des cas pour les deux études. Les anomalies cytogénétiques ainsi que les mutations génétiques ont une répartition identique dans les deux cohortes.

A. La diminution d'expression de *DOK2* est un facteur pronostique dans divers cancers

La sous expression de *DOK2* a été associée à un pronostic péjoratif dans certaines hémopathies malignes et dans des tumeurs solides. Dans le modèle murin Tec-p210bcr/abl qui développe une LMC après un long temps de latence, l'inactivation de *Dok1* et *Dok2* entraîne une accélération du développement de la LMC avec crise blastique ⁷². Dans l'étude de Berger ⁷⁵, le modèle murin invalidé pour *Dok2* développe un adénocarcinome pulmonaire. Sur 199 échantillons de tumeurs pulmonaires de patients, 37% présentent une perte d'une copie de *DOK2* (contre 1.5% de perte pour *DOK1* et *DOK3*) avec pour conséquence une activation de la tumorigénèse. Dans cette étude il est montré que la région du chromosome 8p21.3 dans laquelle se trouve le gène *DOK2* est souvent délétée dans les cancers pulmonaires. Dans l'étude de Miyagaki ⁷⁷, la sous expression de *DOK2* concerne la moitié des 118 patients atteints de cancer gastrique, avec comme conséquence une augmentation de la récurrence et une diminution de la survie totale même après résection curative. La sous expression de *DOK2* est un facteur de mauvais pronostic en analyse multivariée.

B. La diminution de *DOK2* dans les cellules hématopoïétiques favorise leur prolifération et affecte leur différenciation

Dans nos expériences réalisées in vitro, nous avons mis en évidence qu'une sous expression de *DOK2* dans les cellules CD34⁺ suffisait à engendrer un phénotype prolifératif, avec des anomalies de la différenciation granulomonocytaire. C'est également ce que nous retrouvons chez nos patients, où seule la sous expression de *DOK2* entraîne des anomalies de prolifération et de différenciation. En revanche, il n'existe pas de phénotype particulier lorsque les patients ont une sous expression du transcrite *DOK1* (il n'existe pas de lien statistiques retrouvé entre sous expression de *DOK1* et NFS, MDSC....).

Chez les modèles murins, à l'inverse, les deux gènes *dok1* et *dok2* doivent être sous exprimés pour entraîner un syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif (^{72,73} données du laboratoire). On peut donc se demander pourquoi la sous expression de *DOK1* n'entraîne pas des anomalies de prolifération et de différenciation chez nos patients. Plusieurs études portant sur la sous expression de *DOK1* ont montré que son hyperméthylation se retrouvait dans des cancers solides, tels le cancer du poumon ou les cancers ORL ⁷⁹, et dans certaines hémopathies malignes comme le lymphome de Burkitt ⁸⁰ ou la LLC ⁸¹. Une des hypothèses est que les fonctions de *DOK1* et *DOK2* diffèrent selon les tissus et les cellules. La sous expression de l'un ou de l'autre de ces deux gènes dans les cancers pulmonaires vient renforcer cette hypothèse. (adénocarcinomes pulmonaires dans l'étude de Berger ⁷⁵, où *DOK2* est sous exprimé ; carcinome squameux dans l'étude de Saulnier ⁷⁹, où c'est *DOK1* qui est sous exprimé).

C. Les formes prolifératives de LMMC sont de mauvais pronostic

Dans notre cohorte, la sous expression du transcrit *DOK2* est associée aux formes prolifératives de LMMC avec une hyperleucocytose correspondant à une augmentation des PNN et des monocytes. Dans l'ancienne classification FAB, l'hyperleucocytose supérieure à 13 Giga/L distinguait la LMMC dysplasique de la LMMC proliférative ⁶. Plusieurs études ont montré que les formes prolifératives de LMMC, définies selon la classification FAB, étaient associées à une moins bonne survie que les formes dysplasiques.

En 2014, l'étude de Cervera ⁸² rapportait une survie totale à 50 mois de 64% pour les formes dysplasiques et de 28.4% pour les formes prolifératives. Les résultats étaient similaires pour la LFS. Les auteurs proposaient même de réintroduire la distinction forme proliférative et forme dysplasique dans la LMMC du fait de cet impact péjoratif des formes prolifératives sur la survie.

Cette distinction est également sous tendue par l'impact pronostic de la leucocytose dans la LMMC, Les mutations associées à ces formes hyperleucocytaires n'ayant pas le même impact pronostic : la mutation de *RUNX1* est associée à un mauvais pronostic uniquement dans les formes prolifératives.

En 2014 toujours, une étude allemande sur une cohorte de 386 patients proposait six groupes de LMMC : en fonction du nombre de leucocytes (<13Giga/L pour la forme dysplasique, >13Giga/L pour la forme proliférative), puis en fonction du nombre de blastes (<5%, 5 à 9%, 10 à 19%)⁸³. La meilleure survie médiane concernait la LMMC dysplasique avec moins de 5% de blastes (48 mois), et la moins bonne survie se retrouvait pour la LMMC proliférative avec 10à19% de blastes (10 mois).

En 2015, La LMMC proliférative a été confirmée comme étant un facteur de mauvais pronostic sur une cohorte multicentrique regroupant 1011 patients atteints de LMMC (3) : il existait une différence de survie totale significative entre les formes prolifératives et dysplasiques ($p < 0.0001$). Au total, les formes prolifératives de la LMMC ont un plus mauvais pronostic que les formes dysplasiques.

Les deux groupes formés dans notre cohorte selon l'expression de *DOK2* permettent de retrouver ces deux entités : dans le groupe 1, où *DOK2* est sous exprimé, la LMMC prend une forme proliférative, avec une hyperleucocytose moyenne à 19.5 Giga/L au diagnostic (médiane à 14.7 Giga/L), alors que dans le groupe 2 le taux de leucocytes moyen est de 8.7 Giga/L au diagnostic (médiane à 7.2 Giga/L). Ceci suggère donc un pronostic péjoratif pour le groupe 1. Même si l'analyse de survie n'est pas statistiquement significative dans notre étude entre les formes prolifératives et dysplasiques, nous observons une survie totale à 50 mois de 69.4 % pour la forme dysplasique contre 52.1% pour la forme proliférative.

La prolifération leucocytaire retrouvée chez les patients du groupe 1 concerne essentiellement les PNN, et non les monocytes. Ceci est en accord avec nos résultats observés dans nos cultures cellulaires. En effet, les cellules CD34⁺ infectées par le sh*DOK2* montraient un biais de différenciation avec prédominance granulocytaire au dépend des monocytes.

Dans la littérature, la sous expression de *DOK2* entraîne une activation de la voie MAPKinase ^{72,73}. Or, l'activation constitutive de cette voie dans les cellules souches hématopoïétiques entraîne un syndrome myéloprolifératif avec hyperleucocytose, et diminution de l'apoptose ⁸⁴ et peut être une cause de résistance aux traitements ^{85,86}. Ainsi, on peut supposer que le groupe 1 de notre cohorte présente une hyperactivation de la voie MAPkinase, due à la sous expression de *DOK2*, avec pour conséquence une prolifération des cellules tumorales qui présentent également une diminution de l'apoptose, entraînant une forme proliférative de la LMMC. Ce groupe se comporte ainsi comme les patients présentant une mutation de la voie RAS (mutation de NRAS, KRAS et CBL) ⁸⁷.

D. La diminution de *DOK2* est associée à l'accumulation de MDSC

La sous expression de *DOK2* dans notre cohorte est associée à un taux plus important de MDSC. La présence de MDSC est retrouvée dans d'autres pathologies que la LMMC, malignes ou inflammatoires. On les retrouve dans le myélome multiple et la leucémie myéloïde chronique ⁵⁵⁻⁵⁷, dans l'adénocarcinome pancréatique ^{50,51}, le carcinome rénal ^{52,53} ou encore les maladies inflammatoires de l'intestin ⁵⁴ et les sepsis. Elles sont reconnues comme un moyen d'échappement au système immunitaire ⁴⁸ et contribuent aux échecs de l'immunothérapie dans certains cancers ⁴⁹. Dans l'étude de Diaz-Montero ⁸⁸, 106 patients atteints de tumeurs solides ont été étudiés.

Leur taux de MDSC était significativement plus élevé que des sujets sains. Il existait une corrélation entre le taux de MDSC circulantes et le stade clinique du cancer, et parmi les patients de stade IV, le taux de MDSC était corrélé à l'extension des métastases. L'étude de Huang en 2015 ⁸⁹ retrouve les mêmes résultats dans les carcinomes des cellules squameuses de l'œsophage avec un taux de MDSC corrélé au stade clinique TNM. De plus elle montre que le taux de MDSC circulantes est associé à une survie totale diminuée.

Une autre étude de Huang dans les cancers du poumon non à petites cellules retrouvait des résultats similaires⁹⁰. Les MDSC dans le cancer du sein sont aussi associées à un mauvais pronostic ^{91,92}. Dans la LLC, le taux de MDSC est également associé à la progression tumorale et à un pronostic péjoratif ⁹³.

Dans la LMMC, la présence de MDSC a été décrite pour la première fois en 2010 ⁶⁴, avec un rôle immunosuppresseur vis-à-vis des lymphocytes T. De plus, on retrouve comme marqueur pronostic de LMMC des gènes exprimés dans les granulocytes immatures, ⁹⁴, ce que sont les MDSC retrouvées dans la LMMC.

En 2014, l'étude de Wassie ¹² a montré que les patients atteints de LMMC qui présentaient un caryotype anormal, et donc un pronostic péjoratif, avaient également une hyperleucocytose avec augmentation des PNN et présence de MDSC. Ces données corroborent nos résultats, cependant nous n'observons pas de liens entre la présence de MDSC et un caryotype de mauvais pronostic dans notre étude, probablement par le fait d'un faible nombre de patients.

La sous expression de *DOK2* entraîne donc une maladie proliférative et est corrélée à l'augmentation des MDSC, ces trois données étant des facteurs de mauvais pronostic. De plus, un taux de MDSC supérieur à 20% est associé à une diminution de la survie totale dans notre étude. Cependant, nous n'observons pas d'impact sur la survie de la sous expression de *DOK2*.

Cela peut être expliqué par un manque de puissance de l'étude, qui compte un nombre trop faible de patients pour pouvoir observer une différence statistique. Cela peut également être dû à un temps de suivi des patients trop court.

Nous ne retrouvons pas non plus de différence entre le taux d'hémoglobine ou le taux de plaquettes entre les deux groupes, qui sont pourtant des facteurs pronostiques dans la LMMC ^{18,25,27}.

E. La diminution de l'expression de *DOK2* est d'origine épigénétique

Dans la LMMC, la sous expression du transcrit *DOK2* est due à une hyperméthylation de son promoteur. De façon intéressante la plupart des mutations épigénétiques retrouvées dans la LMMC, par exemple *TET2* ou *ASXL1*, entraînent une hyperméthylation de l'ADN et donc la sous expression de plusieurs gènes ^{18,30,95,96}. L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs par des phénomènes épigénétiques est un des mécanismes majeurs dans la carcinogénèse humaine ^{97,98}.

La réponse de la LMMC aux agents déméthylants a été évaluée récemment : il existe un profil moléculaire et transcriptionnel spécifique chez les patients atteints de LMMC ³⁰. Si aucune mutation somatique n'est prédictive de la réponse aux agents déméthylants, il existe en revanche un profil épigénétique distinct entre les patients répondeurs et non répondeurs. Lorsque les patients répondent au traitement, les gènes impliqués dans le cycle cellulaire sont activés, améliorant ainsi la mise en contact des drogues avec l'ADN, alors que lorsque les patients résistent au traitement, on observe une hyperexpression de *CXCL4* et *CXCL7*, impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la résistance à certaines chimiothérapies ^{30,34,35}.

Dans l'étude de Saulnier et al.⁷⁹ portant sur la sous expression de *DOK1* par hyperméthylation dans les cancers solides, il est montré que les agents déméthylants ont la capacité de réexprimer *DOK1* avec pour conséquences une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses.

F. L'observation d'une baisse de *DOK2* ouvre des perspectives thérapeutiques

L'utilisation d'agents déméthylants dans la LMMC pourrait être adaptée au profil épigénétique des patients. Son utilisation chez les patients sous exprimant *DOK2* serait judicieux et pourrait permettre une réexpression de ce gène avec probable diminution de la prolifération et des MDSC. Des études complémentaires sont nécessaires pour étudier ce sujet. Chez les patients sous exprimant *DOK2*, l'analyse de sa réexpression pourrait être un biomarqueur de suivi et d'efficacité au cours d'un traitement par agent déméthylant.

Les patients sous exprimant *DOK2* pourraient répondre à de nouvelles thérapies, dirigées contre la voie de signalisation MAPK hyperactivée ^{14,99}. Ainsi, les inhibiteurs de la signalisation susceptible d'éteindre STAT5, comme le Pacritinib, pourraient être intéressants, cette voie étant classiquement activée dans la LMMC ⁴⁴.

Cibler les cytokines GM-CSF et IL6 serait une alternative thérapeutique pour inhiber les MDSC dans les cancers ¹⁰⁰. De même, dans les modèles murins de cancers du sein, la présence de métastases est associée à une accumulation de MDSC. Cette accumulation est réduite par l'expression de BMP4, qui inhibe la voie Nf-kB, et pourrait être utilisée comme thérapie ⁹¹. Enfin, cibler l'activation de STAT3 pourrait être une thérapie efficace pour inhiber les MDSC, comme ceci est montré dans le cancer pancréatique ¹⁰¹.

V. Conclusion

Notre travail a permis de montrer que la sous expression du gène *DOK2* par méthylation de son promoteur dans les CSH des patients atteints de LMMC semble être l'un des mécanismes de la composante myéloproliférative de cette maladie et de la génération de cellules myéloïdes immunosuppressives. De ce fait, cette anomalie épigénétique pourrait avoir un impact péjoratif sur l'évolution de la maladie. Ce travail suggère de nouvelles approches thérapeutiques dans cette maladie. La meilleure option thérapeutique actuelle, en dehors de l'allogreffe, est l'utilisation d'agents hypométhylants. Ce traitement semble particulièrement adapté au patients sous exprimant *DOK2* : en restaurant l'expression du gène, il devrait réduire l'agressivité de la maladie. Parmi les autres approches thérapeutiques envisageables, les médicaments ciblant la voie JAK/STAT5 ou ciblant directement les MDSC mériteraient d'être explorées.

REFERENCES

1. Vardiman, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem. Biol. Interact.* **184**, 16–20 (2010).
2. Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937–951 (2009).
3. Padron, E. *et al.* An international data set for CMML validates prognostic scoring systems and demonstrates a need for novel prognostication strategies. *Blood Cancer Journal* **5**, e333 (2015).
4. Phekoo, K. J., Richards, M. A., Møller, H., Schey, S. A. & South Thames Haematology Specialist Committee. The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2,112 adult patients in southeast England. *Haematologica* **91**, 1400–1404 (2006).
5. Osca-Gelis, G. *et al.* Population-based incidence of myeloid malignancies: fifteen years of epidemiological data in the province of Girona, Spain. *Haematologica* **98**, e95–97 (2013).
6. Bennett, J. M. *et al.* The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br. J. Haematol.* **87**, 746–754 (1994).
7. Selimoglu-Buet, D. & Solary, E. Chronic Myelomonocytic Leukemia Prognostic Classification and Management: Evidence Base and Current Practice. *Current Hematologic Malignancy Reports* **9**, 301–310 (2014).

8. Bennett, J. M. World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. *Int. J. Hematol.* **72**, 131–133 (2000).
9. Parikh, S. A. & Tefferi, A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am. J. Hematol.* **88**, 967–974 (2013).
10. Selimoglu-Buet, D. *et al.* Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **125**, 3618–3626 (2015).
11. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74–80 (2010).
12. Wassie, E. A. *et al.* Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia: a Mayo Clinic-French Consortium Study. *Am. J. Hematol.* **89**, 1111–1115 (2014).
13. Such, E. *et al.* Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* **96**, 375–383 (2011).
14. Itzykson, R. *et al.* Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* **121**, 2186–2198 (2013).
15. Itzykson, R. & Solary, E. An evolutionary perspective on chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* **27**, 1441–1450 (2013).
16. Bastie, J.-N., Aucagne, R., Droin, N., Solary, E. & Delva, L. Heterogeneity of molecular markers in chronic myelomonocytic leukemia: a disease associated with several gene alterations. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 2853–2861 (2012).
17. Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64–69 (2011).

18. Itzykson, R. *et al.* Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2428–2436 (2013).
19. Aucagne, R., Droin, N., Solary, E., Bastie, J.-N. & Delva, L. [TIF1 γ : a tumor suppressor gene in chronic myelomonocytic leukemia]. *Med Sci (Paris)* **27**, 696–698 (2011).
20. Aucagne, R. *et al.* Transcription intermediary factor 1 γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* **121**, 2361–2370 (2011).
21. Padron, E., Komrokji, R. & List, A. F. The clinical management of chronic myelomonocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* **12**, 172–178 (2014).
22. Itzykson, R., Itzkson, R., Fenaux, P. & Solary, E. Chronic myelomonocytic leukemia: myelodysplastic or myeloproliferative? *Best Pract Res Clin Haematol* **26**, 387–400 (2013).
23. Greenberg, P. *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **89**, 2079–2088 (1997).
24. Greenberg, P. L. *et al.* Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* **120**, 2454–2465 (2012).
25. Patnaik, M. M. *et al.* Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. *Leukemia* **27**, 1504–1510 (2013).
26. Such, E. *et al.* Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **121**, 3005–3015 (2013).
27. Patnaik, M. M. *et al.* ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia* **28**, 2206–2212 (2014).

28. Wattel, E. *et al.* A randomized trial of hydroxyurea versus VP16 in adult chronic myelomonocytic leukemia. Groupe Français des Myélodysplasies and European CMML Group. *Blood* **88**, 2480–2487 (1996).
29. Braun, T. *et al.* Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood* **118**, 3824–3831 (2011).
30. Meldi, K. *et al.* Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* **125**, 1857–1872 (2015).
31. Ghoshal, K. *et al.* 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4727–4741 (2005).
32. Patel, K. *et al.* Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4313–4324 (2010).
33. Griffiths, E. A. & Gore, S. D. DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin. Hematol.* **45**, 23–30 (2008).
34. Han, Z. C. *et al.* Platelet factor 4 and other CXC chemokines support the survival of normal hematopoietic cells and reduce the chemosensitivity of cells to cytotoxic agents. *Blood* **89**, 2328–2335 (1997).
35. Gupta, S. K. & Singh, J. P. Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J. Cell Biol.* **127**, 1121–1127 (1994).

36. Onida, F. *et al.* Management recommendations for chronic myelomonocytic leukemia: consensus statements from the SIE, SIES, GITMO groups. *Haematologica* **98**, 1344–1352 (2013).
37. Eissa, H. *et al.* Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: relapse-free survival is determined by karyotype and comorbidities. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **17**, 908–915 (2011).
38. Park, S. *et al.* Allogeneic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Eur. J. Haematol.* **90**, 355–364 (2013).
39. Cheng, H., Kirtani, V. G. & Gergis, U. Current status of allogeneic HST for chronic myelomonocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **47**, 535–541 (2012).
40. Feldman, E. J. *et al.* On the use of lonafarnib in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* **22**, 1707–1711 (2008).
41. Voso, M. T. *et al.* Valproic acid at therapeutic plasma levels may increase 5-azacytidine efficacy in higher risk myelodysplastic syndromes. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5002–5007 (2009).
42. Kong, G. *et al.* Combined MEK and JAK inhibition abrogates murine myeloproliferative neoplasm. *J. Clin. Invest.* **124**, 2762–2773 (2014).
43. Bachegowda, L. *et al.* Signal transduction inhibitors in treatment of myelodysplastic syndromes. *J Hematol Oncol* **6**, 50 (2013).
44. Kotecha, N. *et al.* Single-cell profiling identifies aberrant STAT5 activation in myeloid malignancies with specific clinical and biologic correlates. *Cancer Cell* **14**, 335–343 (2008).

45. Savona, M. R. *et al.* An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults. *Blood* **125**, 1857–1865 (2015).
46. Yang, R. *et al.* CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res.* **66**, 6807–6815 (2006).
47. Dufait, I. *et al.* Ex vivo generation of myeloid-derived suppressor cells that model the tumor immunosuppressive environment in colorectal cancer. *Oncotarget* **6**, 12369–12382 (2015).
48. Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D. I. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 293–298 (2002).
49. Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology* **9**, 162–174 (2009).
50. Stromnes, I. M. *et al.* Targeted depletion of an MDSC subset unmasks pancreatic ductal adenocarcinoma to adaptive immunity. *Gut* **63**, 1769–1781 (2014).
51. Zhao, F. *et al.* Increase in frequency of myeloid-derived suppressor cells in mice with spontaneous pancreatic carcinoma. *Immunology* **128**, 141–149 (2009).
52. Zea, A. H. *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* **65**, 3044–3048 (2005).
53. Rodriguez, P. C. *et al.* Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res.* **69**, 1553–1560 (2009).

54. Haile, L. A. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* **135**, 871–881, 881.e1–5 (2008).
55. Christiansson, L. *et al.* Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PLoS ONE* **8**, e55818 (2013).
56. De Veirman, K. *et al.* Multiple myeloma induces Mcl-1 expression and survival of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* **6**, 10532–10547 (2015).
57. Gorgun, G. T. *et al.* Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood* **121**, 2975–2987 (2013).
58. Umemura, N. *et al.* Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 1136–1144 (2008).
59. Brandau, S., Moses, K. & Lang, S. The kinship of neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells in cancer: cousins, siblings or twins? *Semin. Cancer Biol.* **23**, 171–182 (2013).
60. Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. & Bronte, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology* **12**, 253–268 (2012).
61. Movahedi, K. *et al.* Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* **111**, 4233–4244 (2008).
62. Nefedova, Y. *et al.* Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J. Immunol.* **172**, 464–474 (2004).

63. Rodríguez, P. C. & Ochoa, A. C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* **222**, 180–191 (2008).
64. Droin, N. *et al.* Alpha-defensins secreted by dysplastic granulocytes inhibit the differentiation of monocytes in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **115**, 78–88 (2010).
65. Mashima, R., Hishida, Y., Tezuka, T. & Yamanashi, Y. The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling. *Immunol. Rev.* **232**, 273–285 (2009).
66. Di Cristofano, A. *et al.* p62(dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl). *J. Exp. Med.* **194**, 275–284 (2001).
67. Lemay, S., Davidson, D., Latour, S. & Veillette, A. Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2743–2754 (2000).
68. Grimm, J. *et al.* Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J. Cell Biol.* **154**, 345–354 (2001).
69. Crowder, R. J., Enomoto, H., Yang, M., Johnson, E. M. & Milbrandt, J. Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **279**, 42072–42081 (2004).
70. Okada, K. *et al.* The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* **312**, 1802–1805 (2006).
71. Yamanashi, Y. *et al.* Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling. *Genes Dev.* **14**, 11–16 (2000).

72. Niki, M. Role of Dok-1 and Dok-2 in Leukemia Suppression. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 1689–1695 (2004).
73. Yasuda, T. Role of Dok-1 and Dok-2 in Myeloid Homeostasis and Suppression of Leukemia. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 1681–1687 (2004).
74. Yasuda, T. *et al.* Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signaling. *Int. Immunol.* **19**, 487–495 (2007).
75. Berger, A. H. *et al.* Identification of DOK genes as lung tumor suppressors. *Nat. Genet.* **42**, 216–223 (2010).
76. Mashima, R. *et al.* Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Lab. Invest.* **90**, 1357–1364 (2010).
77. Miyagaki, H. *et al.* DOK2 as a marker of poor prognosis of patients with gastric adenocarcinoma after curative resection. *Ann. Surg. Oncol.* **19**, 1560–1567 (2012).
78. Quivoron, C. *et al.* TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* **20**, 25–38 (2011).
79. Saulnier, A. *et al.* Inactivation of the putative suppressor gene DOK1 by promoter hypermethylation in primary human cancers. *International Journal of Cancer* **130**, 2484–2494 (2012).
80. Lee, S. *et al.* Dok1 expression and mutation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Lett.* **245**, 44–50 (2007).
81. Lee, S. *et al.* Frameshift mutation in the Dok1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* **23**, 2287–2297 (2004).

82. Cervera, N. *et al.* Gene mutations differently impact the prognosis of the myelodysplastic and myeloproliferative classes of chronic myelomonocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* **89**, 604–609 (2014).
83. Schuler, E. *et al.* Refined medullary blast and white blood cell count based classification of chronic myelomonocytic leukemias. *Leuk. Res.* **38**, 1413–1419 (2014).
84. Chung, E., Hsu, C.-L. & Kondo, M. Constitutive MAP kinase activation in hematopoietic stem cells induces a myeloproliferative disorder. *PLoS ONE* **6**, e28350 (2011).
85. Abrams, S. L. *et al.* The Raf/MEK/ERK pathway can govern drug resistance, apoptosis and sensitivity to targeted therapy. *Cell Cycle* **9**, 1781–1791 (2010).
86. Steelman, L. S. *et al.* Dominant roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell cycle progression, prevention of apoptosis and sensitivity to chemotherapeutic drugs. *Cell Cycle* **9**, 1629–1638 (2010).
87. Ricci, C. *et al.* RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2246–2256 (2010).
88. Diaz-Montero, C. M. *et al.* Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **58**, 49–59 (2009).
89. Huang, H., Zhang, G., Li, G., Ma, H. & Zhang, X. Circulating CD14(+)HLA-DR(-/low) myeloid-derived suppressor cell is an indicator of poor prognosis in patients with ESCC. *Tumour Biol.* (2015). doi:10.1007/s13277-015-3426-y
90. Huang, A. *et al.* Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy

- in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 1439–1451 (2013).
91. Cao, Y. *et al.* BMP4 inhibits breast cancer metastasis by blocking myeloid-derived suppressor cell activity. *Cancer Res.* **74**, 5091–5102 (2014).
 92. Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T. R. & Carson, W. E. Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **140**, 13–21 (2013).
 93. Liu, J., Zhou, Y., Huang, Q. & Qiu, L. CD14(+)HLA-DR(low/-) expression: A novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett* **9**, 1167–1172 (2015).
 94. Bou Samra, E. *et al.* New prognostic markers, determined using gene expression analyses, reveal two distinct subtypes of chronic myelomonocytic leukaemia patients. *Br. J. Haematol.* **157**, 347–356 (2012).
 95. Malcovati, L. *et al.* Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. *Blood* **124**, 1513–1521 (2014).
 96. Figueroa, M. E. *et al.* MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* **114**, 3448–3458 (2009).
 97. Feinberg, A. P. & Tycko, B. The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 143–153 (2004).
 98. Jones, P. A. & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 415–428 (2002).
 99. Padron, E. *et al.* GM-CSF-dependent pSTAT5 sensitivity is a feature with therapeutic potential in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **121**, 5068–5077 (2013).

100. Lechner, M. G., Liebertz, D. J. & Epstein, A. L. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* **185**, 2273–2284 (2010).
101. Panni, R. Z. *et al.* Tumor-induced STAT3 activation in monocytic myeloid-derived suppressor cells enhances stemness and mesenchymal properties in human pancreatic cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 513–528 (2014).

ANNEXE 1. Critères de réponses au traitement dans les SMD/NMP,

d'après Savona et al, Blood 2015.

Table 2. Proposed criteria for measurement of treatment response in adult MDS/MPN

CR (presence of all of the following improvements)*
Bone marrow: $\leq 5\%$ myeloblasts (including monocytic blast equivalent in case of CMML) with normal maturation of all cell lines and return to normal cellularity*
Osteomyelofibrosis absent or equal to "mild reticulin fibrosis" (\leq grade 1 fibrosis)†
Peripheral blood‡
WBC $\leq 10 \times 10^9$ cells/L
Hgb ≥ 11 g/dL
Platelets $\geq 100 \times 10^9/L$; $\leq 450 \times 10^9/L$
Neutrophils $\geq 1.0 \times 10^9/L$
Blasts 0%
Neutrophil precursors reduced to $\leq 2\%$
Monocytes $\leq 1 \times 10^9/L$
Extramedullary disease: Complete resolution of extramedullary disease present before therapy (eg, cutaneous disease, disease-related serous effusions), including palpable hepatosplenomegaly
Provisional category of CR with resolution of symptoms:‡ CR as described above, and complete resolution of disease-related symptoms as noted by the MPN-SAF TSS
Persistent low-level dysplasia is permitted given subjectivity of assignment of dysplasia*
Complete cytogenetic remission
Resolution of previously present chromosomal abnormality (known to be associated with myelodysplastic, syndrome myeloproliferative neoplasms, or MDS/MPN), as seen on classic karyotyping with minimal of 20 metaphases or FISH§
Partial remission
Normalization of peripheral counts and hepatosplenomegaly with bone marrow blasts (and blast equivalents) reduced by 50%, but remaining $>5\%$ of cellularity <i>except</i> in cases of MDS/MPN with $\leq 5\%$ bone marrow blasts at baseline
Marrow response
Optimal marrow response: Presence of all marrow criteria necessary for CR without normalization of peripheral blood indices as presented above.
Partial marrow response: Bone marrow blasts (and blast equivalents) reduced by 50%, but remaining $>5\%$ of cellularity, or reduction in grading of reticulin fibrosis from baseline on at least 2 bone marrow evaluations spaced at least 2 mo apart
Clinical benefit
Requires 1 of the following in the absence of progression or CR/partial response and independent of marrow response (cord blood response must be verified at ≥ 8 wk) to be considered a clinical benefit
Erythroid response
Hgb increase by ≥ 2.0 g/dL
TI for ≥ 8 wk for patients requiring at least 4 packed red blood cell transfusions in the previous 8 wk
Only red blood cell transfusions given based on physician's judgment for a pretreatment Hgb of ≤ 8.5 g/dL will count in the red blood cell TI response evaluation
Platelet response
Transfusion independence when previously requiring platelet transfusions of at least a rate of 4 platelet transfusions in the previous 8 wk
Pretreatment $\leq 20 \times 10^9/L$: increase from $< 20 \times 10^9/L$ to $> 20 \times 10^9/L$ and by at least 100%
Pretreatment $> 20 \times 10^9/L$ but $\leq 100 \times 10^9/L$: absolute increase of $\geq 30 \times 10^9/L$
Neutrophil response
Pretreatment $\leq 0.5 \times 10^9/L$ at least 100% increase and an absolute increase $\geq 0.5 \times 10^9/L$
Pretreatment, $> 0.5 \times 10^9/L$ and $\leq 1.0 \times 10^9/L$ At least 50% increase and an absolute increase $\geq 0.5 \times 10^9/L$
Spleen response
Either a minimum 50% reduction in palpable splenomegaly of a spleen that is at least 10 cm at baseline or a spleen that is palpable at more than 5 cm at baseline becomes not palpable
Symptom response
Improvement in symptoms as noted by decrease of $\geq 50\%$ as per the MPN-SAF TSS scoring < 20 were not considered eligible for measuring clinical benefit.¶

ANNEXE 2. Production des shARN

- Production de particules virales par transfection de cellules 293T

Quatre jours avant la production lentivirale, 500 000 cellules 293T ont été placées dans 20 mL de milieu DMEM complété (10% de SVF décomplémenté, 1% de pénicilline-streptomycine et 1% de L-glutamine) dans des flasques 75cm². 133µL de généticine a ensuite été ajouté dans chaque flasque. Le jour de la transfection, les 20 mL de milieu complété ont été remplacés par 11 mL de milieu DMEM, avec 10% de SVF, 1% de L-glutamine, sans antibiotique.

Un mélange de 500 µL de Jet prime buffer (Polyplus Transfection ®) pour 10 µg d'ADN plasmidique total a été préparé, auquel il a été ajouté, après agitation, 20 µL de Jet prime reagent (Polyplus Transfection ®). Ce mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante, et 500 µL ont été ajoutés dans chaque flasque goutte à goutte, en remuant doucement.

Les cellules 293T transfectées ont été portées dans le laboratoire L3. Le deuxième jour de transfection, le milieu de culture a été changé. Les troisième, quatrième et cinquième jours, le recueil des particules lentivirales a été effectué par ultracentrifugation à 100 000 g, durant deux heures, à 12°C. Les particules récupérées à la fin de l'ultracentrifugation ont ensuite été conservées à -80°C dans le laboratoire L3.

- Construction de vecteurs lentiviraux

Nous avons choisi de diminuer l'expression du gène cible (*DOK2*) dans les cellules humaines CD34⁺ par interférence ARN en utilisant des small hairpin ARN (shARN) introduits dans un vecteur lentiviral. Ceci permet de transduire ces shARN dans les cellules quiescentes comme dans les cellules en division, et d'obtenir une expression stable et durable de la séquence.

Nous avons utilisé le vecteur lentiviral commercial (Sigma®), pLKO.1, fourni avec deux séquences de shARN par gène sous le contrôle du promoteur U6 (Schéma 5).

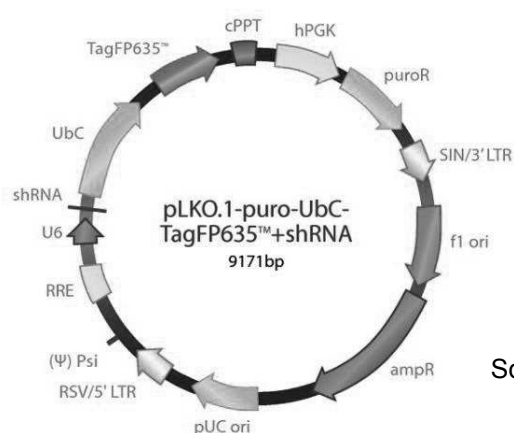


Schéma 5.

Les maxi-préparations avaient été réalisées précédemment. Pour produire ces lentivirus, nous avons aussi utilisé le plasmide transcomplémentant pCMV Δ R8.74 et le plasmide d'enveloppe pMD2G (VSV-G enveloppe).

Pour diminuer l'expression du gène *DOK2*, deux séquences de shRNA, *shDOK2.1* et *shDOK2.2*, couplées au fluorochrome FP635 ou Far Red (FR), ont été achetées. Le contrôle utilisé est un shARN avec des séquences aléatoires (SCR pour scrambled) couplées à FarRed (*shSCR-FR*) (tableau ci-contre).

Plasmides	Séquences	Concentration initiale
pCMV Δ R8.74		1760ng/ μ L
pMD2G		668ng/ μ L
pLKO.1- <i>shDOK2.1</i>	GAAGTGTATGACAATGTTG	306ng/ μ L
pLKO.1- <i>shDOK2.2</i>	CAAGGAATTTGCTGTGACCAT	398ng/ μ L
pLKO.1- <i>shSCR-FR</i>	Séquence aléatoire	2088ng/ μ L

L'efficacité des shRNA a été validée sur des lignées cellulaires afin d'établir la titration virale (lignées leucémiques humaines HL-60, Kasumi-1 et U937). La séquence de shRNA diminuant le mieux l'expression de *DOK2* dans les lignées cellulaires a été retenue. Elle sera appelée *shDOK2* dans la suite de l'exposé.

ANNEXE 3. Extraction et analyse des ARN par RT-qPCR

- Extraction d'ARN

Les culots cellulaires, suspendus dans 700µL de Trizol et conservés à -80°C, ont été agités, incubés cinq minutes dans la glace puis 400µL de chloroforme a été ajouté. Après cinq minutes dans la glace, les échantillons ont été centrifugés (14 000g pendant 20 minutes, à 4°C), les surnageants aqueux contenant les ARN totaux ont été transférés dans des tubes eppendorf contenant 800µL d'isopropanol, et les tubes ont été agités au vortex et conservés à -80°C pendant la nuit. Le lendemain, les tubes ont été décongelés dans la glace, agités et centrifugés (14 000g, 4°C, 20 minutes). Sous la Sorbonne, le surnageant a été enlevé et le culot d'ARN a été séché pendant cinq minutes à l'air libre, puis resuspendu dans 20µL d'eau « RNase free » (Qiagen®) et réhydraté dix minutes dans la glace. La quantité d'ARN dans chaque tube a été déterminée par spectrophotométrie au Nanodrop®.

- Rétrotranscription et analyse en PCR quantitative (en RT-qPCR)

Une rétrotranscription a été effectuée à l'aide de la reverse transcriptase SuperScript II (200U/µL, Invitrogen®) : 0.5µg d'ARN totaux a été incubé à température ambiante avec 1µL d'amorces aléatoires (Random Primers Invitrogen®, 1µg/µL,) durant cinq minutes pour effectuer une pré-hybridation. Un mélange contenant 4µL de tampon de réaction (5X), 2µL d'eau « RNase free », 1µL d'inhibiteur de RNase (RNase OUT, 40U/µL), 1µL de rétrotranscriptase, 2µL de DTT (0.1M) et 4µL de dNTPs (25mM) a ensuite été ajouté dans chaque puits. Les échantillons ont été incubés dans un thermocycleur durant 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 70°C. Les ADNc obtenus ont été conservés à -80°C à ce stade, ou directement analysés par PCR quantitative.

Pour cette PCR quantitative, 10µL de tampon SyberGreen 2X (Applied Biosystems®) ont été déposés dans chaque puits, avant d'ajouter un mélange contenant les amorces spécifiques (0.5µL d'amorces sens (5µM), 0.5µL d'amorces anti-sens (5µM) et 7µL d'eau) et les 2µL d'ADNc dilués. La réaction d'amplification s'est faite après dénaturation de l'ADN à 94°C, hybridation et élongation à 60°C durant 45 cycles (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems®). La spécificité de l'amplicon a été validée par la présence d'un pic unique de dissociation.

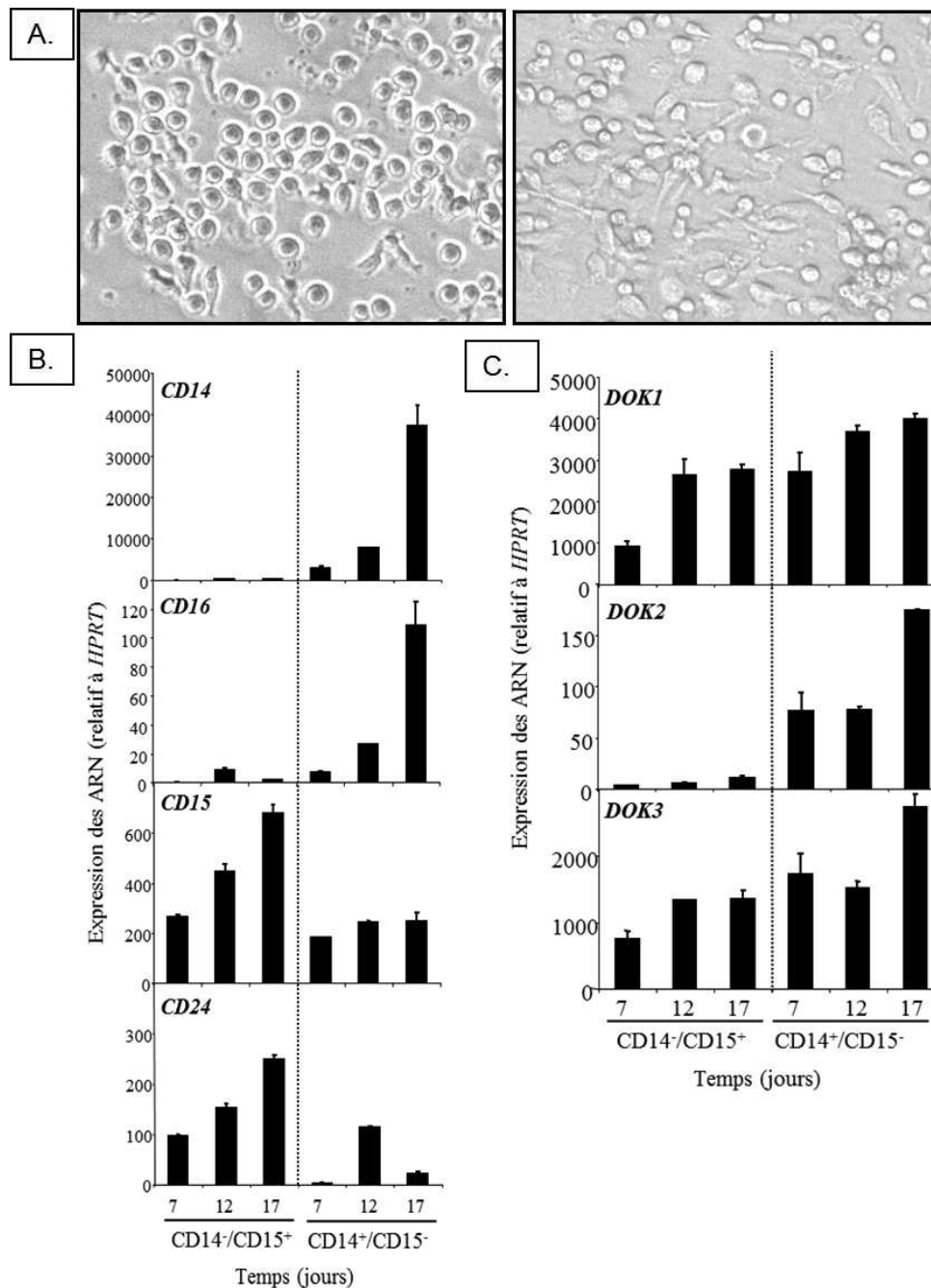
Le tableau ci-dessous récapitule les amorces spécifiques utilisées pour ce travail :

Gène	Sens	Antisens
L32	TGTCCTGAATGTGGTCACCTGA	CTGCAGTCTCCTTGCACACCT
PPIA	GTCGACGGCGAGCCC	TCTTTGGGACCTTGTCTGCAA
HPRT	GGACAGGACTGAACGTCTTGC	CTTGAGCACACAGAG GGCTACA
DOK1	CCAAGCTCGGGTGAAGGA	GTGGCACAGCGTAG TCATCAGT
DOK2	GGCAGTGAAACAAGGCTTCTTG	CGAAGCGGCGCCATT
CD14	TGCGACCACGCCAGAAC	TCGGAGAAGTTGCAGACGC
CD15	AGCGCTGGGTTTGGATGA	AGGAGAGCGTCCAGTTGAAGAG
CD16	AAGCCAGGCCTCGAGCTACT	TGTCTGGCACCTGTACTCTCCA
CD24	GGTTGGCCCCAAATCCA	GACCACGAAGAGACTGGCTGTT
EGR1	TGATGTCCCCGCTGCAG	GTCCATGGTGGGCGAGTG
EGR2	GCCCTTCGCCTGTGACTACT	GTGGCGCTTCTCTCATCA
PU1	GGAGAGCCATAGCGACCATTACT	CGGCGAAGCTCTCGAACTC
CEBPE	AAGGCCAAGAGGCGCATT	CGCTCGTTCTCTGCCATGTA
HNP1-3	CAGCCCCGGAGCAGATT	CATGCAAGGGAAACAACCACTT

ANNEXE 4. Etude de la différenciation granulomonocytaire à partir de cellules

CD34⁺ issues d'unité de sang placentaire

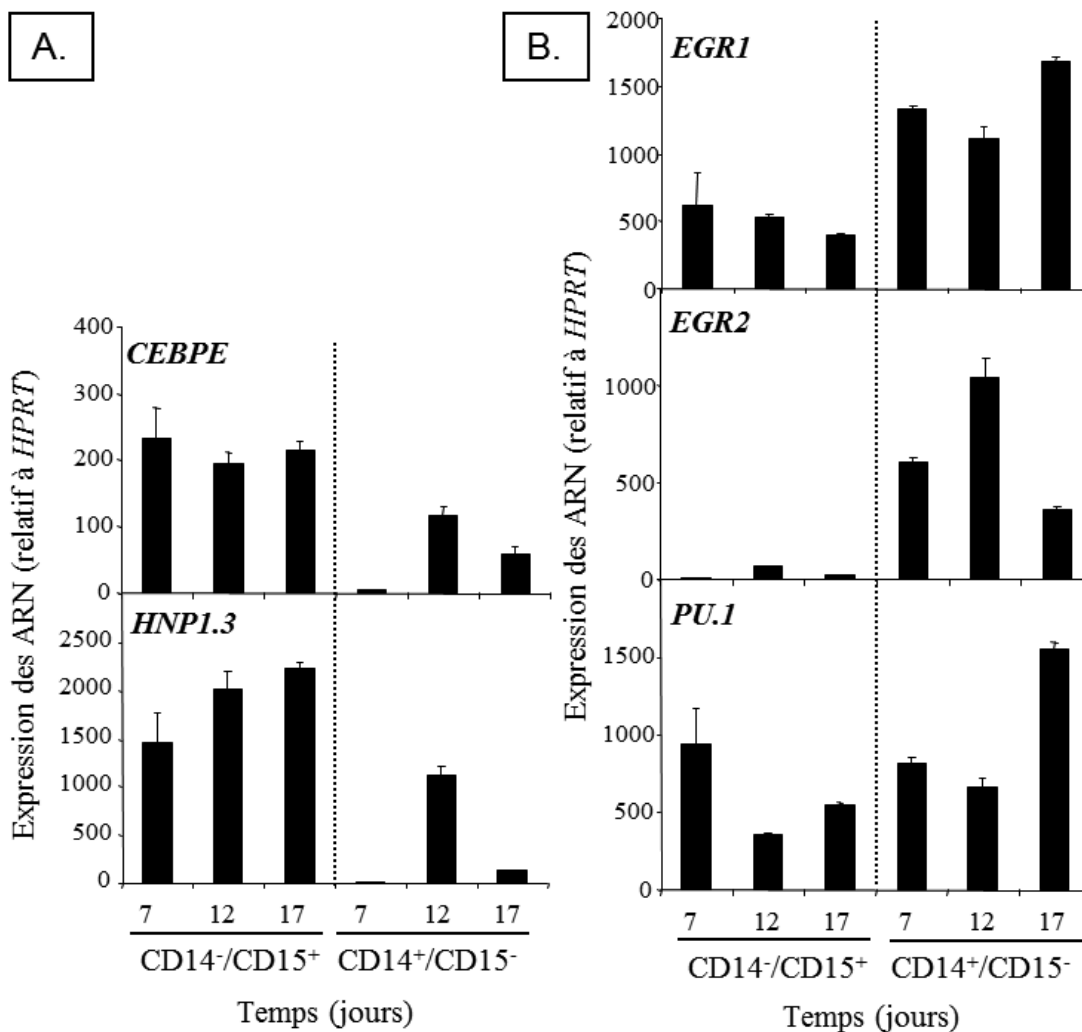
Les cellules CD34⁺ ont été isolées par tri immunomagnétique et cultivées en présence de SCF, IL-3, G-CSF et FLT3-L pendant les temps indiqués. **A** Photo en microscopie optique des populations totales. Niveau d'expression des ARN messagers par RT-qPCR (normalisation par rapport au gène *HPRT*) de *CD14*, *CD16*, *CD15*, *CD24* en (**B**) et de *DOK1*, *DOK2*, *DOK3* en (**C**) dans les populations triées en cytométrie de flux CD14⁻/CD15⁺ et CD14⁺/CD15⁻ aux temps indiqués.



ANNEXE 5. Etude de la différenciation granulomonocytaire à partir de cellules

CD34⁺ issues d'unité de sang placentaire

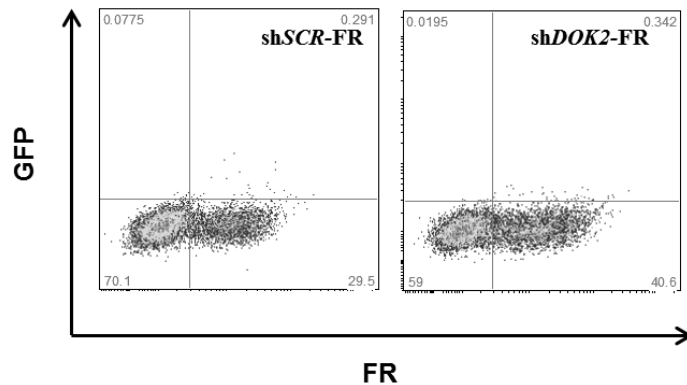
Les cellules CD34⁺ ont été isolées par tri immunomagnétique et cultivées en présence de SCF, IL-3, G-CSF et FLT3-L pendant les temps indiqués. Niveau d'expression des ARN messagers par RT-qPCR (normalisation par rapport au gène HPRT) de CEBPE, HNP1.3 en (A) et de EGR1, EGR2, PU.1 en (B) dans les populations triées CD14⁻/CD15⁺ et CD14⁺/CD15⁻ aux temps indiqués.



ANNEXE 6. Efficacité d'infection des constructions virales dans les cellules

CD34⁺ issues de sang placentaire.

5 μ l de particules virales à J-3 et J-2 contenant les constructions shSCR, ou 5 μ l de particules virales à J-3 puis 2 μ l à J-2 contenant les constructions shDOK2 ont été ajoutés à 100 000 cellules CD34⁺. A J0, l'efficacité d'infection a été vérifiée par cytométrie de flux. Une expérience représentative de 3 expériences indépendantes est montrée ci-dessous.



L'efficacité d'infection est de 29.5% pour les CD34⁺ infectées par le contrôle, et de 40.6% pour les CD34⁺ infectées par le shDOK2.

Introduction : La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie maligne clonale de la cellule souche hématopoïétique (CSH). C'est le plus fréquent des syndromes myélodysplasiques/néoplasmes myéloprolifératifs (SMD/NMP). Elle est définie essentiellement par une monocytose persistante >1 Giga/L. On a observé la présence, dans le sang de patients atteints de LMMC, de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) appartenant au clone leucémique. Ces MDSC sont de type granulocytaire et exercent une activité immunosuppressive vis-à-vis des lymphocytes T. Dans les modèles murins doublement invalidés pour *Dok1* et *Dok2*, on note une accumulation avec l'âge dans le sang et la rate de cellules myéloïdes Ly6G⁺, apparentées à des MDSC. De même, on observe une diminution de l'expression du gène *DOK2* dans les cellules CD34⁺ de certains patients atteints de LMMC, due à une hyperméthylation du promoteur de ce gène. L'expression de *DOK1* est normale chez ces patients.

Hypothèse : La diminution de l'expression de *DOK2* dans les CSH a un impact sur la prolifération et la différenciation granulomonocytaire. Cette diminution d'expression contribue à la génération de MDSC. Chez les patients atteints de LMMC, la diminution de l'expression de *DOK2* pourrait contribuer à une forme proliférative de la maladie et favoriserait l'accumulation de MDSC.

Matériels et méthodes : Des infections cellulaires ont été réalisées pour étudier la différenciation granulomonocytaire de CD34⁺ sous exprimant *DOK2*. 80 patients atteints de LMMC ont été inclus dans notre étude, et le niveau d'expression du gène *DOK2*, la NFS et le taux de MDSC en cytométrie de flux ont été recueillis.

Résultats : En culture cellulaire, la sous expression de *DOK2* stimule la prolifération des cellules CD34⁺ humaines et induit un biais de différenciation au profit de la lignée granulocytaire. Dans notre cohorte de 80 patients atteints de LMMC, deux groupes de patients se distinguent en fonction de l'expression de *DOK2* : le groupe 1 (n= 47) sous exprimant ce gène, et le groupe 2 (n=33) l'exprimant normalement. La sous expression de *DOK2* chez les patients du groupe1 est associée à une forme proliférative de la LMMC, avec un taux de leucocytes à 19.8 Giga/L contre 12.2 Giga/L pour le groupe2 (p=0.009), un taux de PNN à 10.9 Giga/L contre 5.6 Giga/L (p=0.009), et un taux de monocytes à 4.9 Giga/L contre 2.6 Giga/L (p=0.03). L'analyse en cytométrie de flux a mis en évidence un taux de MDSC statistiquement plus élevé chez les patients du groupe1 par rapport aux patients du groupe2 (26.6% et 9.2%, respectivement, p=0.017). Il n'existe pas de différence entre les deux groupes du taux d'hémoglobine, de plaquettes ou de lymphocytes (p=0.642, p=0.08 et p=0.499, respectivement). Il n'y a pas de différence en termes de survie globale ou de survie sans progression entre les 2 groupes, (p=0.818 et p=0.738, respectivement). Il existe par contre une différence de survie entre les patients présentant plus de 20% de MDSC par rapport à ceux qui en possèdent moins de 20% (p=0.038).

Conclusion : La diminution de l'expression de *DOK2*, d'origine épigénétique, entraîne une forme proliférative de LMMC avec accumulation de MDSC, ce qui en fait une forme de mauvais pronostic. Les patients concernés pourraient être de bons candidats au traitement par agent hypométhylant, comme l'azacytidine, qui pourraient restaurer l'expression du gène et ainsi réduire l'agressivité de la maladie.

Mots clés : leucémie myélomonocytaire chronique, MDSC, *DOK2*, agent hypométhylant.