



HAL
open science

Intérêt de l'expression du CD90 dans le pronostic des LMMJ

Florian Piques

► **To cite this version:**

Florian Piques. Intérêt de l'expression du CD90 dans le pronostic des LMMJ. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-03475294

HAL Id: dumas-03475294

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03475294v1>

Submitted on 10 Dec 2021

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'État de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2 - L 335.10

UNIVERSITÉ DE PARIS

Faculté de Santé

UFR de Médecine

Année 2020

N° 1

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le : 10 janvier 2020

Par

Florian PIQUES

Intérêt de l'expression du CD90 dans le pronostic des LMMJ

Dirigée par Mme la Docteure Aurélie Caye-Eude

JURY

M. le Professeur Eric Pasmant

Président

M. le Professeur Jean-Hugues Dalle

Membre du jury

Mme la Professeure Karen Leroy

Membre du jury

Mme la Docteure Aurélie Caye-Eude

Directrice

Remerciements

A M. le président du Jury, Professeur Eric PASMANT, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Au Professeur Hélène CAVE, pour m'avoir confié ce sujet et pour sa participation importante à la supervision de cette thèse.

A ma directrice de thèse, Docteur Aurélie CAYE-EUDE, pour son temps, ses conseils et sa relecture attentive.

Au Professeur Karen LEROY, pour la qualité de son encadrement lors de mon passage dans son service.

Au Professeur Jean-Hugues DALLE, pour avoir accepté rapidement et avec beaucoup de bienveillance d'être membre de ce jury.

Aux équipes de médecins, pharmaciens, biologistes, techniciens des laboratoires de génétique moléculaire de l'hôpital Robert Debré et de l'hôpital Cochin, et la Pitié en particulier aux Dr Chloe ARFEUILLE, Dr Severine DRUNAT, Dr Anne Laure FAURET AMSELLEM, Dr Nathalie COUQUE, Dr Yoann VIAL, Dr Valerie CHUNE, Dr Cyril BURIN DES ROZIERS, Dr Nadim HAMZAOUI, Dr Noémie BASSET, Dr Erell GUILLERM, Dr Florence COULET.

A ceux qui m'ont donné le goût de la génétique, Pr D. STOPPA-LYONNET, Dr B. BUECHER, Pr. S. ROMANA, Pr. S. LYONNET, Pr M. VIDAUD, A. de PAUW.

Aux amis, co-internes, futurs collègues pour ces moments de complicités, Voreak, Violaine, Pacifique, Marianne, Valentine, Laura, Édouard, Laurence, Aurélie, Alexis, Quentin, Hamza, Joan, Lucas, Hadrien, Maxime, Arnaud, Joséphine, Seher, Ambroise, Raphaëlle, Magalie, Thibault, Adèle, Louise, Aurélien.

A mes parents, Corinne et Jean-Denis pour leur soutien indéfectible toutes ses années, à Corentin et Capucine, à mes grand-parents, et toute ma famille.

Table des matières

Table des matières	3
Table des figures	7
Abréviations	10
I Introduction	11
1 La Leucémie Myéломonocytaire Juvénile	13
Préambule	13
Epidémiologie	13
Diagnostic positif.....	14
Diagnostics différentiels.....	15
Syndrome de Wiskott-Aldrich	15
Ostéopétrose	16
Lymphohistiocytose familiale hématophagique.....	18
Pronostic et traitement.....	19
2 LMMJ et voie RAS	21
Préambule	21
La voie RAS.....	21
Les protéines RAS	23
La régulation de la voie RAS	23
Les régulateurs positifs de RAS	24
Les régulateurs négatifs de RAS	25
Rasopathies.....	26
Syndrome de Noonan.....	26
Syndrome CBL	27
Neurofibromatose de type 1	28
Autres Rasopathies.....	29
3 Aspects pronostiques des LMMJ	31
Préambule	31
Facteurs de risque traditionnels	31
Facteurs de risques liés à la mutation initiatrice	31
Les LMMJ syndromiques	32
Les LMMJ sporadiques.....	34
Facteurs de risque par mutations additionnelles.....	35
Monosomie 7	35
Mutations additionnelles dans la voie RAS.....	35
Mutations additionnelles dans la voie du polycomb	35

	Anomalies de la méthylation de l'ADN dans les LMMJs . . .	38
3.5	LIN28B	40
	Préambule	40
	Inhibition de la maturation des miRNAs par LIN28A/B . . .	40
	Activation des cibles des let-7 par LIN28A/B.....	42
	Expression de LIN28 au cours de l'hématopoïèse	42
	Rôle oncogénique de LIN28B	43
	Surexpression de LIN28B dans les LMMJs.....	44
4	CD90 (THY-1)	45
	Préambule	45
	Fonctions biologiques de CD90	45
	Expression au cours de l'hématopoïèse	47
	Expression du CD90 dans les LMMJ.....	48
5	digital droplet PCR (ddPCR)	49
	Préambule	49
	Principe de la digitale PCR	49
	Intérêt de la PCR digitale.....	51
6	Objectif de l'étude	53
II	Matériels et Méthodes	55
7	Matériels et Méthodes	57
	Patients.....	57
	Techniques	58
	Extraction de l'ARN	58
	qRT-PCR.....	58
	droplet digital PCR.....	58
	Statistiques.....	59
III	Résultats	61
8	Cohorte LMMJ	63
	Préambule	63
	Concordance entre ddPCR et cytométrie en flux.....	64
	Cohorte LMMJ	65
	Expression du CD90 et LIN28B.....	68
	Préambule	68
	Expression du CD90 selon la mutation initiatrice	69
	Expression de LIN28B selon la mutation initiatrice	70
	Corrélation LIN28B et HbF	71
9	CD90 et facteurs pronostiques	73
	Facteurs de risque traditionnels	73
	Facteurs de risque moléculaires	74
	Facteurs de risque cliniques.....	76
	Performances diagnostiques	78

10 Etudes de survie	79
Préambule	79
CD90 et survie	80
LIN28B et survie.....	82
Corrélation CD90 et LIN28B	84
IV Discussion	87
11 Cohorte LMMJ	89
Rappel des objectifs	89
Concordance CMF et ddPCR.....	89
Expression CD90 et LIN28B	90
12 CD90 et facteurs de mauvais pronostiques	91
Facteurs de risque.....	91
13 Etudes de survie	93
13.1 CD90.....	93
13.2 LIN28B et CD90.....	94
Conclusion	97
Bibliographie	99

Table des figures

2.1 Récepteur au GM-CSF.....	22
2.2 La Régulation de RAS	24
2.3 Structure de SHP2.....	24
2.4 Récapitulatif des Rasopathies.....	29
3.1 Mutations non exclusives dans les LMMJ.....	36
3.2 Le Polycomb Repressive Complex de type 2	37
3.3 Mode d'action de LIN28A et LIN28B	41
3.4 Cibles biologiques de LIN28.....	42
3.5 Expression de LIN28 au cours de l'hématopoïèse	43
4.1 Modes d'action hypothétiques de CD90	46
4.2 Hématopoïèse et immunophénotypage chez l'être Humain.....	47
4.3 Surexpression de CD90 en CMF.....	48
5.1 PCR digitale.....	50
8.1 Seuil de surexpression de CD90.....	64
8.2 Expression du CD90 en cytométrie en flux et en ddPCR.....	65
8.3 Récapitulatif de la cohorte LMMJ	66
8.4 Légende de la cohorte LMMJ	67
8.5 Expression du CD90 par sous-groupes	69
8.6 Expression de LIN28B par sous-groupes	70
8.7 Comparaison multiple groupe LIN28B - test de Kruskal-Wallis.....	70
8.8 Corrélation LIN28B-HbF.....	71
9.1 Facteurs de risque traditionnels et CD90	74
9.2 Facteurs de risque et CD90	75
9.3 Facteurs de risque cliniques et CD90.....	76
9.4 CD90 et facteurs pronostiques	77
9.5 Courbes ROC pour CD90 et LIN28B	78
10.1 Survie sans évènement en fonction du CD90.....	80
10.2 Survie globale en fonction du CD90	80
10.3 Survie sans évènement en fonction du CD90 chez les patients greffés	81
10.4 Survie globale en fonction du CD90 chez les patients greffés.....	81
10.5 Survie sans évènement en fonction de LIN28B	82
10.6 Survie globale en fonction de LIN28B	82
10.7 Survie sans évènement en fonction de LIN28B - patients greffés . . .	83
10.8 Survie globale en fonction de LIN28B- patients greffés.....	83
10.9 Corrélation entre LIN28B et CD90.....	84
10.10 Survie sans évènement LIN28B et CD90.....	85
10.11 Survie globale LIN28B et CD90.	85

10.12	Survie sans évènement LIN28B et CD90 (patients greffés).....	86
10.13	Survie globale LIN28B et CD90 (patients greffés).	86

Abréviations

AA : Acide Aminé

aLMC : Leucémie Myéloïde Chronique atypique

CAM : Cell Adhesion Molecules

CCHC : Motif conservé dans les protéines à doigts de zinc cellulaires ou rétro-virales. Il comporte des cystéines et une histidine espacées dans cette ordre

cDNA : ADN complémentaire

CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

CMF : Cytométrie en Flux

CMV : Cytomégalovirus

Cq/Ct : Quantification Cycle/Cycle Threshold

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

ddPCR : digital droplet PCR

EBV : Epstein-Barr Virus

EFS : Event Free Survival

FHL : Lymphohistiocytose Familiale Hématophagique

GAP : Guanosine-triphosphatase-Activating Protein

GDP : Guanosine diphosphate

GEF : Guanosine Exchange Factor

GIST : Gastro Intestinal Tumor

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GMP : Granulocyte-Macrophage Progenitor

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

GTP : Guanosine triphosphate

HbF : Hémoglobine Fœtale

HHV : Human Herpes Virus

HR : Hazard Ratio

HSC : Cellules Souches Hématopoïétiques

IC : Interval de Confiance

KO : Knock-out

Lin-28B : Lin-28 homolog B
LMMC : Leucémie Myélo-Monocytaire Chronique
LMMJ : Leucémie Myélo-Monocytaire Juvénile
MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase
miRNA : MicroRNA
MNC : Cellules Mononuclées Totales
MPNST : Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumours
Mutations : Variants Pathogènes
NFS : Numération Formule Sanguine
NK : Natural Killer
NMP : Néoplasie Myeloproliférative
NoLS : Nucleolar Localization Sequence
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
PRC1/2 : Polycomb Repressive Complex 1/2
PTP : Protein Tyrosine Phosphatase
QI : Quotient Intellectuel
RALD : RAS-associated Autoimmune Leukoproliferative Disorder
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
SH : Src-Homology
SMD : Syndrome Myélodysplasique
SMP : Syndrome Myélo-Prolifératif
SMP-U : Syndromes Myéloprolifératifs inclassables
SOS : Son-Of Sevenless
TCA : Temps de Céphaline Activée
TP : Temps de Prothrombine
TUTase : Terminal UridylylTransferase
UBA/LZ : homologous to Ubiquitin-Associated/Leucine Zipper domain)
VAF : Variant Allele Frequency
VWF : Von Willebrand Factor
WAS : Wiskott Aldrich Syndrome

Première partie

Introduction

Chapitre 1

La Leucémie Myélomonocytaire Juvénile

Préambule

La Leucémie Myélo-Monocytaire juvénile (LMMJ) est une hémopathie chronique de l'enfant qui se caractérise par une prolifération excessive des cellules de la lignée myélomonocytaire.

La LMMJ appartient aux syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs (SMD / SMP) dans la classification OMS 2016 [1]. Cette catégorie regroupe 5 hémopathies avec atteinte de la lignée myéloïde qui partagent des éléments cliniques, biologiques ou morphologiques des syndromes myéloprolifératifs et myélodysplasiques :

Syndromes Myélodysplasiques/Myéloprolifératifs (OMS 2016)
--

Leucémie Myélo-Monocytaire Chronique (LMMC)

Leucémie Myéloïde Chronique atypique (aLMC), BCR-ABL-

Leucémie Myélo-Monocytaire juvénile (LMMJ)
--

Syndromes Myélodysplasiques/Myéloprolifératifs avec sidéroblastes en couronne et thrombopénie (SMD/SMP-RS-T)
--

Syndromes Myélodysplasiques/Myéloprolifératifs inclassables (SMD/SMP-U)

Epidémiologie

La Leucémie Myélo-Monocytaire juvénile est une hémopathie agressive qui touche surtout les enfants de 1 mois à 7 ans, avec une médiane au diagnostic à 20 mois de vie. Il s'agit d'une pathologie rare, avec une incidence estimée à 1,2 sur 1 million d'enfants par an [2].

Diagnostic positif

La présentation clinique est celle d'une hémopathie avec des signes généraux (Fièvre, Asthénie), un syndrome tumoral et des signes d'insuffisance médullaire.

Le syndrome tumoral est particulièrement marqué avec des lymphadénopathies, et une hépato-splénomégalie. La splénomégalie est d'ailleurs le seul critère clinique obligatoire pour établir le diagnostic selon l'OMS. La splénomégalie peut cependant être absente dans environ 7 % des cas [3], et apparaître plus tardivement.

En outre, des signes cutanés sont parfois présents tels que des lésions érythémateuses, maculo-papuleuses ou des xanthogranulomes multiples [2, 3].

Sur le plan biologique, une hyperleucocytose > 10 G/L est fréquente, souvent associée à une anémie normo-macrocytaire arégnérative et une thrombopénie.

La formule sanguine retrouve une monocytose > 1 G/L. Une faible myélémie est possible, mais classiquement peu de précurseurs myéloïdes circulent dans cette pathologie.

Comme il s'agit d'une hémopathie chronique, la blastose médullaire est < 20 % en dehors d'une acutisation.

Dans cette pathologie, l'hémoglobine HbF, constituée d'un tétramère $\alpha_2\gamma_2$ est élevée pour l'âge. Normalement, la chaîne γ est remplacée progressivement par la chaîne β pour constituer l'hémoglobine de l'adulte HbA $\alpha_2\beta_2$. Il subsiste néanmoins une faible production d'HbF chez l'adulte, pour < 2 % de l'hémoglobine totale produite [4].

Les progéniteurs hématopoïétiques ont la particularité d'être capable de proliférer spontanément, c'est à dire en l'absence de facteur de croissance. Ils possèdent une hypersensibilité au GM-CSF qui s'accompagne d'une hyperphosphorylation de STAT5 en réponse à une faible concentration de GM-CSF [2].

Sur le plan génétique, dans 90 % des cas, des variants pathogènes sont retrouvés dans les gènes *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *NF1* ou *CBL*. Une monosomie 7 est aussi fréquente. La classification OMS 2016, précise par ailleurs qu'il doit s'agir de variants somatiques de *PTPN11*, *KRAS* ou *NRAS*, et que des variants constitutionnels doivent être exclus.

En conclusion, les critères diagnostiques OMS 2016 pour la LMMJ sont les suivants :

Critères diagnostiques de la LMMJ (OMS 2016)
I. Critères cliniques et hématologiques (les quatre sont obligatoires) <ol style="list-style-type: none">1. Monocytose dans le sang périphérique $\geq 1 \cdot 10^9$/L2. Taux de blastes $< 20\%$ dans le sang périphérique et la moelle osseuse3. Splénomégalie4. Absence de chromosome de Philadelphie (BCR/ABL1 non réarrangé)
II. Critères génétiques (1 élément suffisant) <ul style="list-style-type: none">- Mutation somatique dans <i>PTPN11</i>, <i>KRAS</i> ou <i>NRAS</i>- Diagnostic clinique ou moléculaire d'altération du gène <i>NFI</i>- Mutation germinale dans <i>CBL</i> et perte d'hétérozygotie de <i>CBL</i>
III. Pour les patients qui remplissent les critères I. pour lesquels aucun critère génétique n'a été retrouvé, les éléments suivants doivent être présents : <ul style="list-style-type: none">- Monosomie 7, ou toute anomalie chromosomique, ou au moins 2 des critères suivants :<ol style="list-style-type: none">1. Hémoglobine Fœtale augmentée pour l'âge2. Précurseurs myéloïdes ou érythroïdes3. Hypersensibilité au GM-CSF sur des tests sur colonies4. Hyperphosphorylation de STAT5

Diagnostics différentiels

Les diagnostics différentiels sont les infections à Herpesviridae, en particulier appartenant au sous-familles des betaherpesvirinae et gammaherpervirinae : le CMV, l'HHV, l'EBV ou bien à parvovirus B19.

Le syndrome de Wiskott-Aldrich, l'ostéopétrose et la lymphohistiocytose hémato-phagique peuvent aussi mimer une LMMJ.

Syndrome de Wiskott-Aldrich

Découvert en 1937 par le pédiatre allemand Alfred Wiskott et rapporté en 1954 par l'américain Robert Aldrich, le syndrome de Wiskott-Aldrich est une maladie récessive liée à l'X due à des variants de type perte de fonction du gène *WAS* situé en Xp11.23. Ce gène code pour la protéine WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein) exprimée uniquement dans les cellules hématopoïétiques où elle joue un rôle dans la polymérisation de l'actine et le remodelage du cytosquelette. Elle participe aussi à la transcription du gène *TBX21*, un régulateur essentiel de la réponse immunitaire TH 1 [5]. *WAS* est aussi un gène suppresseur de tumeur dans les lymphomes T [6].

Le syndrome de Wiskott-Aldrich se manifeste par des infections, un syndrome hémorragique et de l'eczéma. Les patients se présentent avec une thrombopénie à $< 100\,000$ plaquettes/mm³ avec volume plaquettaire moyen < 7.5 fL et des manifestations telles que atopie, auto-immunité et néoplasies.

Il existe une variabilité clinique importante chez les individus atteints de syndrome de Wiskott-Aldrich. De plus, les variants du gène *WAS* peuvent donner

également d'autres entités cliniques : la thrombopénie liée à l'X qui est associée à des mutations hypomorphes, et la neutropénie congénitale sévère liée à l'X causée par des mutations gains de fonction.

La prévalence des cancers est de 13 - 22 % avec un âge de survenue moyen de 9,5 ans. On recense surtout des lymphomes non-Hodgkiniens mais aussi des leucémies lymphoblastiques, des myélodysplasies, des syndromes myéloprolifératifs, et d'autres tumeurs telles que séminomes, carcinomes testiculaires, gliomes, neuromes et sarcomes de Kaposi [7, 5].

Le traitement repose essentiellement sur une thérapeutique anti-infectieuse et le traitement des complications auto-immunes.

La prise en charge s'accompagne de l'éducation thérapeutique du patient pour éviter les comportements à risque hémorragique à cause de la thrombopénie. Transfusions prophylactiques de plaquettes et immunoglobulines polyclonales peuvent aussi être proposées. La splénectomie peut être discutée pour accroître les taux de plaquettes, mais elle expose à un risque infectieux accru.

Le seul traitement curatif est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Il existe quelques cas rapportés dans la littérature d'enfants de sexe masculin avec syndrome de Wiskott-Aldrich qui remplissent au moins en partie les critères diagnostiques de la LMMJ [8, 9, 10].

Une thrombopénie ainsi qu'une monocytose > 1 G/L est constante. Dans 6 cas (Yoshimi et al.) [10], la présence de plaquettes géantes a été notée. Enfin, tout les variants étaient de type perte de fonction (non-sens ou décalage du cadre de lecture) et conduisaient à une expression protéique diminuée ou absente.

Par ailleurs, il a été rapporté des variants somatiques gains de fonction dans WAS (p.Ala274Thr et p.Leu270Pro) chez des patients atteints de LMMJ avec mutation de *PTPN11* et *NRAS* [11]. Il a été supposé que ces variants, comme dans la neutropénie liée à l'X, augmentent la translocation de WASP dans le noyau cellulaire. WASP est capable de se lier de façon indirecte au niveau de régions promotrices, et de conduire à la surexpression de RUNX1 et du récepteur au GM-CSF quand il possède la mutation activatrice p.Leu270Pro [12].

Ostéopétrose

L'ostéopétrose, également appelée « maladie des os de marbre » est une maladie génétique caractérisée par une augmentation de la masse osseuse.

Elle est due à une altération de la balance entre formation et résorption osseuse. Cette altération du remodelage osseux est donc soit due à un excès de formation osseuse, soit à un défaut de la fonction de l'ostéoclaste.

A ce titre, elle ne constitue pas une maladie unique, mais un groupe hétérogène de maladies causées par des altérations dans différents gènes, et avec des modes d'hérédité différents : Autosomique récessif, autosomique dominant et récessif lié à l'X.

Les manifestations sont plus ou moins sévères en fonction du gène impliqué. Elles incluent des anomalies squelettiques et dentaires, des déformations osseuses

et un risque fracturaire augmenté. En outre, l'augmentation de la densité osseuse va se compliquer d'une réduction de l'espace médullaire osseux, ce qui va provoquer une atteinte hématologique à type d'anémie sévère, de pancytopénie, et d'infections récidivantes. L'atteinte médullaire va provoquer également une hématoïèse extra-médullaire avec hépatosplénomégalie. Une atteinte neurologique par atteinte des forams des nerfs crâniens va aussi être observée, pouvant conduire à une surdité, une cécité et à une paralysie faciale.

La forme autosomique récessive la plus fréquente est liée à des mutations bialléliques dans *TCIRG1* (T cell immune regulator 1), qui code pour la sous-unité $\alpha 3$ du complexe V0 de la pompe à proton V-ATPase. Celle-ci est exprimée principalement au niveau des ostéoclastes et de la membrane apicale des cellules gastriques pariétales. Les ostéoclastes des patients mutés *TCIRG1* vont ainsi montrer une activité de résorption osseuse défectueuse. Par ailleurs, la pompe V-ATPase jouant aussi un rôle dans l'absorption du calcium, les patients présentent parfois un rachitisme ou une ostéomalacie associée.

Une autre altération génétique fréquente est celle causée par des variants type perte de fonction ou dominant négatif dans le gène *CLCN7* (Chloride Voltage-Gated Channel 7) en 16p13.3.

Ce gène code pour un canal voltage dépendant H^+/Cl^- qui agit dans les endosomes tardifs et les lysosomes. Le KO du gène dans un modèle murin est responsable d'une abolition de la fonction de résorption chez l'ostéoclaste.

Il existe trois entités d'ostéopétrose associées à *CLCN7* :

La forme autosomique récessive infantile maligne, une ostéopétrose intermédiaire autosomique, et l'ostéopétrose autosomique dominante de type II. La forme récessive a une expression néonatale. Elle est associée à des anomalies osseuses liées à la dysfonction des ostéoclastes. Le patient souffre d'une ostéosclérose avec des fractures récurrentes des os longs, un retard de croissance, des anomalies du crâne pouvant entraîner une hydrocéphalie [13, 14, 15].

Cette pathologie est associée à une réduction de l'espérance de vie dans les formes infantiles sévères. La prise en charge est essentiellement symptomatique et repose sur un traitement orthopédique, une supplémentation vitamino-D-calcique, et des transfusions de plaquettes et de globules rouges. La greffe de cellules souches hématopoïétiques est réservée au cas les plus graves, c'est-à-dire essentiellement les formes autosomiques récessives.

Le diagnostic différentiel est difficile avec la LMMJ. Hoyoux et al. ont rapporté un cas qui remplissait l'ensemble des critères diagnostiques pour la LMMJ avec une ostéopétrose infantile maligne (la forme autosomique récessive). Les éléments qui différaient par rapport à la LMMJ étaient une hypogammaglobulinémie (là où les patients avec LMMJ ont souvent une hypergammaglobulinémie), des PAL augmentées, et des radiographies du squelette qui montraient des os denses, fortement radio-opaque [16].

Lymphohistiocytose familiale hématophagique

La lymphohistiocytose familiale hématophagique est une maladie autosomique récessive dont il existe 5 sous-types (FHL1 à 5). Il s'agit d'un état hyper-inflammatoire d'origine génétique qui peut être difficile à distinguer d'une lymphohistiocytose hématophagique secondaire.

Elle est caractérisée par un défaut dans une ou plusieurs protéines impliquées dans la cytotoxicité lymphocytaire T et NK.

Des variants pathogéniques dans un de ces quatre gènes ont été identifiés : PRF1 (FHL2), UNC13D (FHL3), STX11 (FHL4), and STXBP2 (FHL5).

Le gène responsable de la forme FHL1 demeure inconnu, même si on sait que le locus se trouve en 9q22.

D'autres pathologies entraînent également des lymphohistiocytoses hématophagiques :

Les formes liées à l'X : XPL-1 et XPL-2, respectivement causées par des mutations dans SAP/SHD2D1A et XIAP/BIRC4, et des mutations dans RAB27A (RAS-associated protein) et LYST (Lysosomal trafficking regulator).

La maladie est déclenchée par une infection virale simple, alors que le patient était en bonne santé jusqu'à présent. Ceci a lieu en moyenne à l'âge de 3 mois. Les patients présentent un syndrome d'activation macrophagique, ils peuvent développer des atteintes neurologiques variées, comme des anomalies du tonus, une ataxie, des convulsions, des héli ou tétraplégies, une cécité et des troubles de la vigilance pouvant aller jusqu'au coma [17, 18].

Le diagnostic est établi en remplissant 5 des 8 critères clinico-biologiques établis par la Histiocyte Society [19, 20] :

1. Fièvre
2. Cytopénies
3. Splénomégalie
4. Hypertriglyceridémie et/ou hypofibrinogénémie
5. Hyperferritinémie
6. Augmentation du CD25 soluble (sCD25)
7. Diminution ou absence d'activité des cellules NK
8. Image d'hématophagie présente à la biopsie tissulaire.

La greffe de cellules souches hématopoïétiques est systématique, car en l'absence de traitement le décès survient 1 à 2 mois après le début de la lymphohistiocytose hématophagique [21].

La stratégie thérapeutique se divise en deux étapes : dans un premier temps, un traitement immunosuppresseur est mise en place dans le but de contrôler l'état hyper-inflammatoire du patient. Puis, dans un second temps, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est réalisée.

Il a été décrit quelques cas d'association LMMJ et lymphohistiocytose hémaphagique secondaire, dans des contextes particuliers de Xanthogranulome Juvenile 1 sans [22] ou avec Neurofibromatose [23], ou avec maladie de Kikuchi 2 [24].

Pronostic et traitement

La LMMJ est une pathologie avec un pronostic sombre, peu sensible à la chimiothérapie conventionnelle. Sans greffe de cellules souches hématopoïétiques, la survie était de 15 % à 5 ans et 8 % à 10 ans (Niemeyer et al. Blood 1997) [25].

La mortalité est principalement liée à l'infiltration des tissus par les cellules myéloïdes, ou bien son acutisation, souvent en LAM4 ou 5 [3].

La cause du décès est principalement une défaillance multiviscérale, souvent en raison de co-morbidités cardiaques ou pleurales. Cependant dans plusieurs cas, le rôle de la présence d'infiltrats tumoraux dans différents organes comme le cœur ou le poumon a été prouvé histologiquement [26].

Le seul traitement efficace à ce jour est la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Le pronostic reste sombre, avec une survie sans progression à 5 ans de 50 %. La rechute de la leucémie est la principale cause d'échec du traitement.

Actuellement, le pronostic va varier de manière importante. D'un coté, certaines LMMJ prennent la forme d'un syndrome myéloprolifératif avec régression spontanée, de l'autre certaines LMMJs très agressives, rechutent après greffe de cellules souches hématopoïétiques. Ceci va dépendre de facteurs cliniques, biologiques, cytogénétiques et moléculaires qui seront traités en détail dans le chapitre 3.

-
1. Une anomalie des cellules dendritiques, avec surtout une atteinte cutanée à type de nodules jaune-brun infiltrés par des histiocytes.
 2. Maladie inflammatoire avec fièvre et lymphadénopathie cervicale.

Chapitre 2

LMMJ et voie RAS

Préambule

Il est maintenant assez admis que la LMMJ est une maladie de la cellule souche hématopoïétique [27].

Ceci d'une part, parce que les anomalies chromosomiques ou génétiques de la LMMJ sont retrouvées dans les cellules myélomonocytaires, les cellules erythroïdes, et même parfois dans les lymphocytes B et T. D'autre part parce qu'un profil d'inactivation de l'X identique a été retrouvée dans les monocytes, granulocytes, réticulocytes, plaquettes et cellules CD34+CD38- [28].

Dans la majorité des cas, les LMMJ surviennent de façon sporadique, mais dans $\frac{1}{3}$ des cas elles surviennent dans un contexte de maladies constitutionnelles, les Rasopathies. Dans 90 % des cas, des variants pathogènes sont retrouvés dans les gènes *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *NF1* ou *CBL* dans les LMMJ. Dans le reste des cas, des mutations touchant des petites protéines G ont été rapportées (*RIT1*, *RRAS*, *RRAS2*) [29, 30].

Ces gènes s'intègrent dans la voie des RAS/MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), dont la dérégulation est la base moléculaire des LMMJ.

La voie RAS

La voie RAS participe à la signalisation cellulaire en transmettant des informations en provenance du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Ces signaux extracellulaires prennent la forme de ligands hydrosolubles présents dans le microenvironnement de la cellule.

Elle joue un rôle majeur dans la prolifération cellulaire, la migration, la survie, et la détermination du destin cellulaire et la différenciation [31]. Elle intervient à la fois dans le développement précoce et tardif, et c'est une voie majeure impliquée en oncologie.

La transduction du signal commence par la liaison d'un ligand au domaine extracellulaire d'un récepteur transmembranaire de la membrane cellulaire. Il s'agit de récepteurs à activité tyrosine kinase, ou bien de récepteurs à cytokine type GM-CSF. L'interaction ligand-récepteur a lieu après une dimérisation préalable entre deux récepteurs tyrosine kinase. Cela est rendu possible grâce à des mouvements

latéraux des récepteurs au niveau de la membrane plasmique.

La liaison ligand-récepteur provoque un changement de conformation responsable de la phosphorylation des domaines intra-cellulaires des récepteurs (voir figure 2.1). Cette conformation est reconnue par des protéines adaptatrices comme GRB2, SHP-2, SHC qui recrutent des protéines effectrices, comme SOS1 un facteur d'échange nucléotidique de guanine de type GEF (Guanosine Exchange Factor). Cette dernière agit sur les protéines RAS, et transforme la forme RAS-GDP inactive en RAS-GTP actif, par remplacement du GDP en GTP.

A l'état actif, lié au GTP, RAS va initier des cascades de de signalisation comme la voie des MAPKinases, la voie PI3K-AKT ou celle de JAK/STAT [32]. In fine, ces cascades de signalisation aboutissent à la modification de cibles cytosoliques, membranes, ou encore à la translocation de facteurs de transcription dans le noyau où ils vont assurer la régulation de l'expression génique.

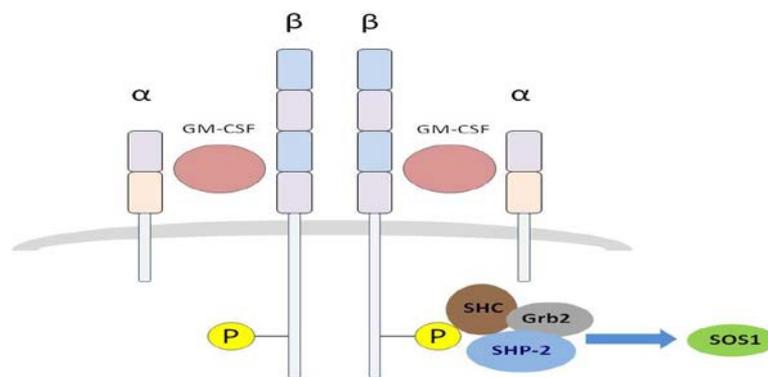


Figure 2.1 – Représentation schématique simplifiée du récepteur au GM-CSF (GM-CSFR).

Il existe une chaîne α , codée par le gène *CSF2RA* spécifique du GM-CSFR, et une chaîne β , codée par *CSF2RB* commune à IL-3R et IL-5R. Un hexamère est constitué de 2 ligands (le GM-CSF), 2 chaînes β et 2 chaînes α . En réalité, le GM-CSFR forme un dodécaèdre composé de deux hexamères. La liaison du ligand au CSFR conduit à la phosphorylation des tyrosines dans le domaine intracytoplasmique et le recrutement de protéines adaptatrices.

D'après Hansen et al., et Becher et al. [33, 34, 26]

Les protéines RAS

Les gènes ras (pour rat sarcoma virus) font partie des premiers oncogènes identifiés (le premier étant Src), grâce aux travaux sur le virus du sarcome du rat par Kristen et Harvey pendant la fin des années 70 et le début des années 80.

Ce rétrovirus a capturé dans son génome ces gènes au cours de l'évolution et est désormais capable d'insérer ces séquences virales dans l'ADN de la cellule qu'il infecte. Les séquences virales comportent souvent une substitution, sur les codons 12 ou 13 et plus rarement 61, capable d'induire une transformation maligne des cellules infectées.

En pathologie humaine, la responsabilité des virus dans la survenue de cancer reste faible, mais l'étude des virus a pu révéler l'intérêt majeur de ces gènes dans l'oncogénèse.

Les homologues cellulaires de KRAS et HRAS ont été identifiés en 1981 chez le rat [35], puis chez la souris [36] et l'Homme en 1982 [37]. N-ras est identifié en 1983 à partir des lignées cellulaires de neuroblastomes [38].

Les protéines RAS sont une famille de protéines G de 20 à 29 kDa ancrées à la membrane du côté feuillet interne. Elles subissent des modifications post-traductionnelles afin de permettre leur ancrage au feuillet interne de la membrane cellulaire :

Elles possèdent en C-terminal un motif CAAX qui va être reconnu par une enzyme, la farnésyl transférase [31]. Ce site recevra donc l'addition d'un lipide isoprénoïde farnésyl au cours d'une isoprénylation.

Les protéines RAS sont ainsi liées à la membrane cellulaire du côté intracytoplasmique.

On dénombre un nombre important de membres de la famille Ras :

Il existe 36 gènes Ras qui codent pour 39 protéines. Elles ont la capacité de se lier au GDP ou au GTP, et une activité GTPase intrinsèque.

On peut citer notamment RIT1, qui présente 50 % d'homologie avec les protéines RAS classiques (KRAS, HRAS et NRAS), une activité GTPase mais en revanche elle ne possède pas de motif de prénylation (CAAX, XXCC, CXC) [30]; ou encore RRAS, avec une homologie de 55-60 % avec les autres protéines RAS, qui contient une séquence unique en N-terminal de 26 acides aminés [29].

La régulation de la voie RAS

L'activation des protéines RAS est finement régulée :

Elle repose sur une balance entre des GEF (Guanosine Exchange Factors), qui remplacent le GDP par le GTP et activent RAS, et des GAPs (GTPase Activating Proteins) qui accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP en potentialisant l'activité GTPase intrinsèque de RAS, et inactive RAS (voir figure 2.2) [39].

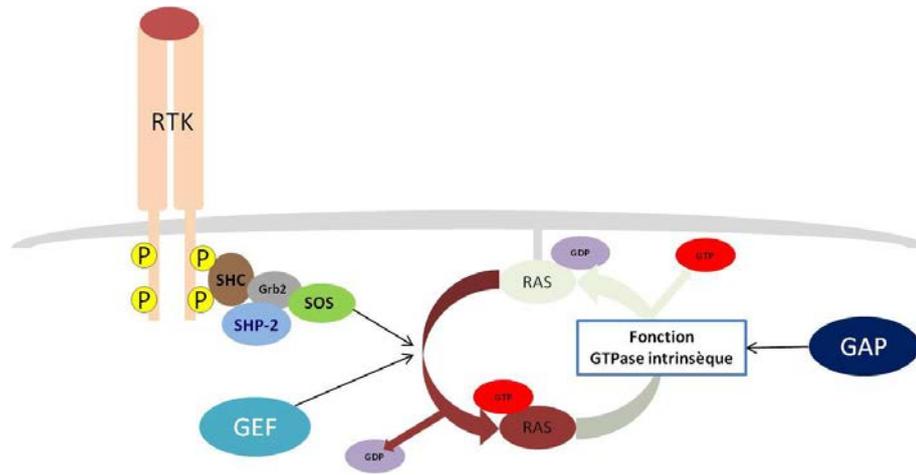


Figure 2.2 – La Regulation de RAS.

L'activation des Récepteurs Tyrosine kinase (RTK) permet le recrutement de protéines adaptatrices qui activent les GEFs (Guanosine Exchange Factors) telles que SOS. Les GEFs catalysent l'échange du GDP lié aux protéines RAS en GTP, ce qui active la protéine RAS. Ce signal est régulé par l'activité GTPase intrinsèque de RAS qui est potentialisée par les GAPs (GTPase Activating Proteins).

Les régulateurs positifs de RAS

SHP2

Au niveau de l'activation du récepteur tyrosine kinase, la protéine adaptatrice SHP-2 (Src homology-region 2-domain phosphatase-2), codée par *PTPN11* en 12q24.13, est un régulateur positif du signal.

Il s'agit d'une tyrosine phosphatase, qui possède 2 domaines SH2 (src-homology 2) : N-SH2 et C-SH2, un domaine PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) et une extrémité carboxy-terminale (voir figure 2.3) [40].

Selon des données de cristallographies, à l'état basal, SHP2 est en configuration inactive quand le domaine N-SH2 interagit avec PTP. Cependant, lorsque le domaine N-SH2 se lie à un résidu phosphotyrosil (pY), ceci entraîne un changement de conformation qui réduit l'interaction entre le domaine N-SH2 et le domaine PTP. N-SH2 agirait comme un commutateur qui active ou inactive la protéine SHP2. Le site catalytique devient accessible au substrat, et la protéine joue son rôle de phosphatase [41].

Elle bloquerait l'action d'inhibiteurs de RAS, tels que Sprouty, Src, ou des RAS-GAP (Guanosine-triphosphatase-Activating Protein).



Figure 2.3 – Structure de SHP2. D'après Pannone et al. [42]

SOS1/SOS2

SOS1 et 2 pour Son-Of Sevenless, il s'agit de GEFs (Guanine nucléotide Exchange Factors) de RAS, situées respectivement en 2p22.1 et 14q21.3. Ils simulent la libération du GDP de RAS, ce qui promeut l'activation de RAS par sa liaison au GTP [43].

SHOC2

SHOC2 est une protéine de soutien constituée en majorité de séquence LRR (Leucine Rich Repeats), et une région KEKE (Alternance de Lysine et d'acide Glutamique) en N-terminal.

SHOC2 agirait en faisant le lien entre les protéines RAS et leurs partenaires d'aval. Il a été notamment décrit qu'en se liant à M-RAS, il permet la translocation de PP1C (Catalytic subunit of Protein Phosphatase 1) à la membrane. Cette phosphatase va déphosphoryler la Serine 259 de RAF1, ce qui aura pour conséquence la stabilisation de RAF1 et donc l'activation de la voie des MAPKinases [44, 45].

Les régulateurs négatifs de RAS

NF1

La neurofibromine codée par le gène de 60 exons, *NF1*, est une RAS-GAP située en 17q11.2, qui joue un rôle de régulateur négatif par activation de la fonction GTPase intrinsèque des protéines RAS.

CBL

CBL, également régulateur négatif, est une E3-ubiquitine ligase qui place sur le récepteur tyrosine kinase une marque ubiquitine qui va avoir pour conséquence l'endocytose du récepteur et sa dégradation dans les lysosomes [39]. La protéine virale v-Cbl était déjà connu comme oncogène qui bloque l'endocytose des récepteurs.

Ainsi, en inhibant la dégradation du récepteur lors d'une altération de CBL, le récepteur va s'accumuler à la surface de la cellule. L'amplification d'un récepteur est un événement oncogénique classique qui entraîne soit une hyperréactivité à des concentrations même faibles de ligands, soit même une activation ligand indépendante en déplaçant la réaction vers la forme dimérisée [39].

Elle présente une région N-terminale de liaison au domaine tyrosine kinase (TKB) des RTK, suivie d'un domaine RING-finger impliqué dans l'activité E3 ubiquitine ligase, puis un domaine proline riche, et enfin une séquence UBA/LZ (homologous to ubiquitin-associated/leucine zipper domain) qui joue un rôle dans la liaison avec l'ubiquitine et la dimérisation de la protéine [46].

RASA1/RASA2

RASA1, situé en 5q14.3, code pour la protéine p120, une Ras-GAP qui possède une région d'homologie avec Src en N-ter, et un pleckstrin homology domain en C-term.

RASA2, situé en 3q23, code pour une autre Ras-GAP : Ras p21 Protein Activator 2 [47].

SPRED1

SPRED1, pour Sprouty-Related EVH1 Domain Containing 1, est localisé en 15q14. C'est un régulateur négatif de Ras qui agit en inhibant la phosphorylation de RAF. De plus, il se lie à NF1 et induit sa localisation au niveau la membrane cellulaire. Ainsi, il permet à NF1 d'exercer son rôle de GAP, ce qui fait donc de *SPRED1* un régulateur négatif.

Rasopathies

Les Rasopathies sont des pathologies constitutionnelles dont les bases génétiques sont une dysrégulation de la voie RAS/MAPK. La voie RAS/MAPK joue un rôle important dans le développement, où elle contrôle la migration cellulaire, la prolifération, la survie cellulaire et la différenciation.

Les patients atteints de Rasopathies présentent des anomalies comme une dysmorphie faciale, des dysfonctionnements cardiaques, des déficits cognitifs, des altérations ectodermiques et squelettiques, ainsi qu'une susceptibilité à certains cancers.

Les Rasopathies ont donné lieu à des descriptions de syndromes cliniques distincts qui ont été corrélées à des mutations de certains gènes de la voie RAS.

Il existe cependant un chevauchement important entre les différents syndromes cliniques, et une expressivité variable pour un même phénotype.

Syndrome de Noonan

Cette maladie a été découverte en 1963 par le Dr Jacqueline Noonan. Son incidence est de 1 pour 2000 naissances.

Elle présente les anomalies phénotypiques suivantes :

Une dysmorphie faciale 1, un retard de croissance post-natale, un pterygium colli 2, une cardiopathie malformative (souvent une sténose de l'artère pulmonaire) ou une cardiomyopathie hypertrophique et un pectus excavatum.

1. Hypertélorisme, ptosis palpébral, fentes palpébrales obliques en bas et en dehors, un épicanthus, nez retroussé, oreilles bas implantées, en rotation postérieure, avec un lobule saillant, un philtrum avec piliers marqués.

2. Repli bilatéral au niveau du cou, fait de tissus cutanées et sous-cutanée, qui s'étend latéralement de la mastoïde à l'acromion.

D'autres atteintes cardiaques sont décrites comme des coarctations de l'aorte, et des anomalies du septum atrio-ventriculaire. Des anomalies squelettiques sont aussi rapportées comme des déformations vertébrales et cervicales [40].

Sur le plan du neuro-développement, une hypotonie avec un retard moteur est fréquente. Chez 20 % des cas, il existe un retard d'acquisition du langage. Le QI est variable (entre 50 et 120) avec une déficience intellectuelle (QI < 70) dans 20 % des cas. Dans 30 à 40 % des difficultés d'apprentissage sont observées.

D'autres signes sont inconstants :

Cryptorchidie, hyperkératose, anomalies du scalp, lymphœdème, troubles de la coagulation, maladies auto-immunes, déficience intellectuelle, troubles de l'apprentissage.

Cette pathologie autosomique dominante à pénétrance quasi-complète mais avec une expressivité variable est causée dans 50 % des cas par des variants gains de fonction affectants la protéine SHP2 (cf voie RAS/MAPK), codée par *PTPN11*, situé en 12q22. Pour le reste des cas, les gènes impliqués sont : *SOS1* (10-13 %), *RAF1* (10 %), *KRAS* (< 5 %), *RIT1* (< 5 %), *BRAF* (< 2 %), *MEK1* (< 2 %), *RRAS* (< 2 %) et *NRAS* (< 2 %), *SOS2* (probablement < 1 %) [26, 43].

Plus récemment, le gène *LZTR1*, un suppresseur de tumeur, connu comme facteur de susceptibilité dans les schwannomatoses multiples, a été également décrit comme responsable de syndrome de Noonan [48, 49].

Ainsi, il s'agit de variants dans des protéines régulatrices positives de la voie RAS/MAPK qui ont pour conséquence son hyperactivation.

Dans leur revue de la littérature, Kratz et al. ont estimé l'incidence cumulée de cancer à l'âge de 20 ans à 4 % pour les patients atteints de syndrome de Noonan. Les principaux cancers rapportés étaient des Neuroblastomes et gliomes, des hémopathies malignes (LAL, LAM) et des rhabdomyosarcomes [50].

La prise en charge de cette pathologie a fait l'objet d'un (PNDS) Protocole national de diagnostic et de soins pour les maladies rares en octobre 2016.

Pour ce qui est du dépistage des hémopathies, outre un bilan initial qui comprend une NFS et un bilan de coagulation étendue TP, TCA, fibrinogène, activité des facteurs de la voie exogène et endogène, activité co-facteur de la ristocétine du VWF, il n'y a pas de surveillance particulière recommandée. Il n'y a pas d'intérêt à faire une NFS régulière pour dépister une hémopathie aigüe, même si le dépistage des syndromes myélodysplasiques a été discuté jusqu'à 2 ans.

Syndrome CBL

Le syndrome CBL est souvent associé avec un phénotype atténué de syndrome de Noonan, avec comme particularité le risque de développement d'une vascularite [46].

Sur le plan génétique, *CBL* fonctionne comme un gène suppresseur de tumeur, conférant une prédisposition aux cancers à l'état hétérozygote, alors qu'un deuxième « hit » est retrouvé dans les cellules cancéreuses. Cependant, il existe

toujours en tumoral une perte d'hétérozygotie avec un nombre de copie conservé, ou isodisomie acquise. Les variants sont majoritairement des faux sens, avec un hotspot en p.Y371H.

Ainsi il est suggéré, qu'en situation d'isodisomie acquise la fonction ubiquitine ligase est abolie, mais une activité biochimique essentielle est maintenue [51].

Neurofibromatose de type 1

La Neurofibromatose de type 1 est une maladie autosomique dominante, par perte de fonction de la neurofibromine codée par *NF1*, gène du locus 17q11.2. La perte de ce régulateur négatif de la voie RAS/MAPK est également responsable d'une hyperactivation de cette voie de signalisation et d'anomalies du développement.

C'est une pathologie fréquente avec une incidence estimée à 1/3000 naissances et 20 000 patients en France. Elle survient de novo dans 50 % des cas.

Diagnostic : Les critères diagnostiques sont définis par la conférence de consensus de 1988 [52] :

Diagnostic NF1
Deux critères ou plus :
6 taches café-au-lait ou plus, de > 5 mm de grand diamètre chez des individus pré-pubaires, et > 15 mm chez des individus post-pubaires
2 ou plus neurofibromes, de n'importe quel type, ou bien 1 ou plus neurofibromes plexiformes
Lentignes axillaires ou inguinales
Gliome des voies optiques
2 ou plus nodules de Lisch (hamartomes iriens)
Une lésion osseuse distincte telle qu'une dysplasie du sphénoïde ou un amincissement du cortex d'un os long avec ou sans pseudarthrose
Un apparenté du premier degré atteint de neurofibromatose de type 1 qui remplit ces critères

La Neurofibromatose de type 1 prédispose à différentes tumeurs. Les plus spécifiques de la pathologie sont les neurofibromes bénins, constants dans cette maladie, par perte du second allèle en intra-tumorale. Leur gravité est liée à leur potentiel d'évolution maligne en tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques (MPNST).

D'autres sous-types tumorales sont décrits : Gliomes des voies optiques (15-20 %), GIST (Gastro Intestinal Tumor) (5-30 %), Phéochromocytomes (0.1-13 %), Rhabdomyosarcomes (1-6 %), Gliomes malins (0.8 %), et un sur-risque de cancer du sein de 8.4 % à 50 ans [53].

En outre, il existe une augmentation du risque de LMMJ d'un facteur 200 à 500 fois, qu'il faut cependant relativiser car la fréquence des leucémies dans la NF1 est < 1% [53].

Son principal diagnostic différentiel est le syndrome de Legius, et la dysmorphie

faciale des patients atteints de neurofibromatose se rapproche de celle des patients atteints de syndrome de Noonan.

Autres Rasopathies

Enfin, il existe d'autres Rasopathies : le syndrome de Noonan avec lentigines multiples, le syndrome de Noonan avec cheveux anagènes caducs, le syndrome de Costello causé par des variants dans le gène *HRAS* [54], le syndrome cardiofaciocutané en majorité dû à des variants dans *BRAF*, ou le syndrome de Legius avec inactivation du gène *SPRED1* [55, 54, 51, 56].

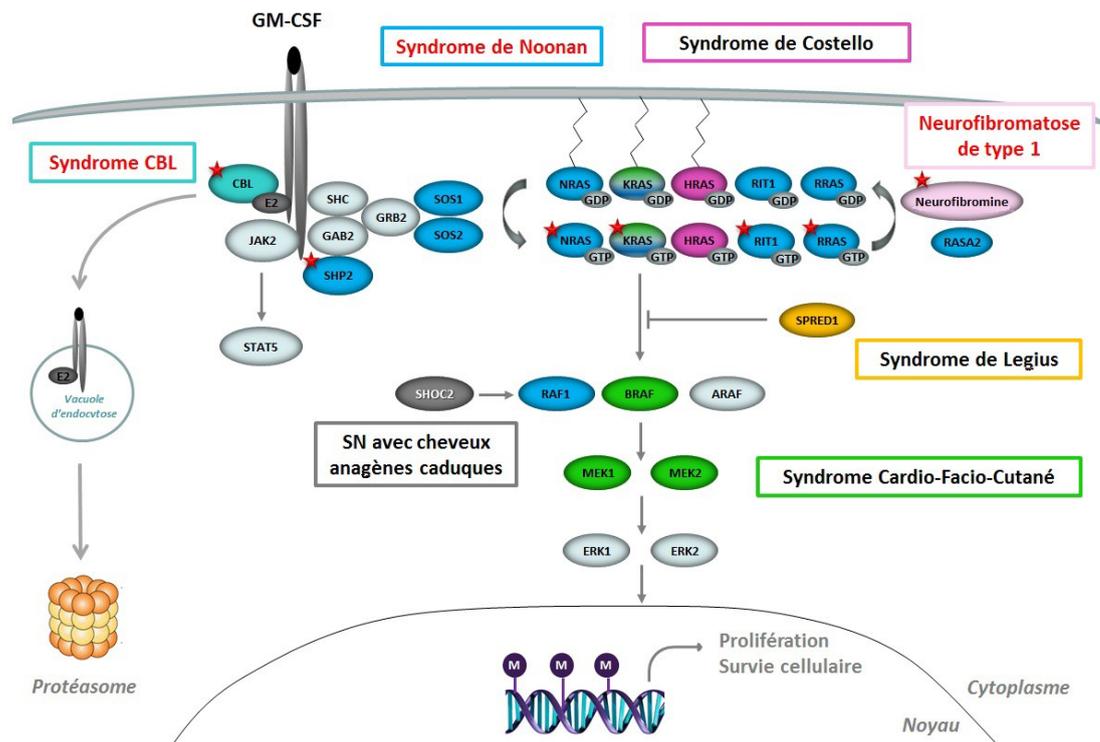


Figure 2.4 – Récapitulatif des Rasopathies

Schéma de la voie RAS et des différents gènes mutés en germinal dans les Rasopathies. D'après Strullu et Cavé [26].

Chapitre 3

Aspects pronostiques des LMMJ

Préambule

Comme vu précédemment, les LMMJs peuvent prendre des formes très agressives, dans lesquelles la greffe de cellules souches hématopoïétiques est le seul recours. Même dans ces conditions, la rechute post-greffe est fréquente et le pronostic péjoratif.

A l'inverse, certaines LMMJs sont indolentes, marquées par une myéloprolifération bénigne, et parfois même une régression spontanée. Dans ces cas là, une greffe exposerait le patient de façon totalement inutile à des complications potentiellement mortelles, telles que la maladie du greffon contre l'hôte, les complications infectieuses, et la toxicité liée au conditionnement [57].

Il existe tout un spectre entre ces deux extrêmes, aussi il est nécessaire d'identifier des facteurs pronostiques à même de prédire l'issue d'une LMMJ, et ainsi guider l'hématologue dans sa décision de recourir ou non à la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétique.

Facteurs de risque traditionnels

Les facteurs traditionnels de mauvais pronostic sont un âge élevé au diagnostic, un taux d'hémoglobine fœtal (HbF) élevé pour l'âge et une thrombopénie.

Les seuils varient selon les auteurs dans la littérature :

Un âge au diagnostic > 2 ans [58], ou > 4 ans est de mauvais pronostic [25].

La thrombopénie < 100 G/L [58], voire < 33 G/L [25] est associée à un mauvais pronostic.

Un taux d'HbF > 15 % [25] a un pronostic défavorable tandis qu'une HbF < 10 % est de bon pronostic [59].

Facteurs de risques liés à la mutation initiale

Les LMMJ surviennent dans 1/3 des cas dans un contexte syndromique, dans le cadre des Rasopathies. Les plus fréquemment associées aux LMMJ sont le syn-

drome de Noonan (surtout par mutation *PTPN11*), la neurofibromatose de type 1 et le syndrome CBL.

Les LMMJ syndromiques

Néoplasie Myéloproliférative liée au syndrome de Noonan (NS-NMP)

Environ 5 % des patients atteints de syndrome de Noonan avec mutation *PTPN11* développent dans la petite enfance une néoplasie myéloproliférative (NMP) répondant dans la moitié des cas aux critères diagnostics de LMMJ [60].

La NMP simple associée au syndrome de Noonan (NS-NMP) est de bon pronostic, souvent spontanément résolutive et ressemble aux syndromes myéloprolifératifs transitoires observés dans la trisomie 21.

Néoplasie Myéloproliférative liée au syndrome de Noonan (NS-NMP)

La NS-LMMJ mutée *PTPN11* débute dans la majorité des cas en période néonatale. Elle est habituellement agressive, conduisant à une prise en charge réanimatoire, et le décès survient fréquemment.

Le spectre mutationnel diffère entre les NS-LMMJ mutées *PTPN11* et les LMMJ sporadiques mutées *PTPN11*. Il existe une différence de distribution des variants de *PTPN11* dans les LMMJ sporadiques et celle liée au Noonan. Les variants pathogènes typiques des LMMJ sporadiques sont peu représentés dans le syndrome de Noonan.

Tartaglia et al. ont proposé une classification des variants pathogènes de *PTPN11* [41] en 6 groupes :

Le groupe I comprend des variants situés dans le domaine d'interaction N-SH2/PTP (T2, N58, G60, D61, Y62, Y63, E69, F71, A72, T73, E76, Q79, Q256). Ils agiraient en stabilisant SHP-2 en configuration active.

Le groupe II comporte des variants au niveau de la surface de PTP. Ils sont importants pour la stabilité du site catalytique à l'état inactif, et participe aussi à l'activité catalytique (Y279, I282, A461, G464, Q506 et Q510).

Le groupe III regroupe aussi des variants de PTP qui assure la stabilité du site catalytique, mais ils jouent un rôle dans le contrôle de la spécificité du substrat (G502 et G503).

Le groupe IV : ce sont des mutations qui affectent les résidues qui maintiennent la structure de PTP (F285, N308, I309, et P491), ou interagissent avec les acides aminés qui servent l'activité catalytique (G268, T468, R498, R501, et M504).

Les mutations du groupe V affectent les acides aminés dans la poche de liaison au phosphopeptide au niveau des domaines SH2 (A42, L43, et E139). Ils perturberaient la spécificité de liaison aux phosphopeptides ou leur affinité.

Enfin, les variants du groupe VI sont dans la zone de liaison entre le domaine N-SH2 et C-SH2 altéreraient la mobilité ou leur orientation l'une par rapport à

l'autre (D106 et E110).

Tartaglia et al. avait retrouvé une sur-représentation des variants de classe I et III dans les formes sporadiques (respectivement 85 % de classe I et 10.5 % de classe III) [41]. Dans les mutations d'origine germinales, les classes I sont présentes en moindre fréquence (42 %), suivies des classes IV (34 %), et des classes II (11.5 %).

Il est postulé que les variants de LMMJ sporadiques ont un effet gain de fonction plus fort que les LMMJ des Rasopathies.

Une des hypothèses qui expliquerait la différence de distribution est la létalité des variants des LMMJ sporadiques lorsqu'ils surviennent en germinale. Cette hypothèse est notamment supportée par l'étude de Mason-Suares et al. [61] :

Ils ont publié une petite série de 4 cas de formes sévères de syndrome de Noonan détectées en prénatal. La clinique était majoritairement marquée par un hygroma, un hydrops ou un hydrothorax.

L'évolution a été défavorable, ou bien la grossesse a été interrompue dans 2 cas. Dans le premier, le patient est décédé à 2 jours de vie d'une hypertension pulmonaire secondaire à l'hypoplasie pulmonaire liée à l'anasarque foeto-placentaire. Dans le second cas le patient a développé une LMMJ et une entérocolite nécrotique qui ont conduit au décès.

Les variants de PTPN11 retrouvés étaient de classe I : PTPN11 : p.Glu76Gly, PTPN11 : Ala72Thr (les deux autres étaient NRAS : p.Gly12Ser).

Cette classification est cependant à pondérer car elle n'explique pas l'ensemble des variants retrouvés.

LMMJ syndromique liée à la neurofibromatose de type 1 (NF1-LMMJ)

Les LMMJ syndromiques chez les patients atteints de neurofibromatose de type 1 sont agressives, présentent un taux de blastes plus élevé au diagnostic (un taux médian 8 % contre 4 %, $p = 0.040$ pour les autres patients dans la cohorte de Niemeyer et al. [25]). La LMMJ peut être inaugurale, et précéder tout signe clinique de neurofibromatose [62].

Chez les patients *NF1*, une inactivation du second allèle a lieu en somatique dans la cellule hématopoïétique [63, 64]. Aucune corrélation génotype-phénotype n'a pu être clairement mise en évidence entre la mutation germinale de *NF1*, la gravité de la *NF1* sous-jacente et le risque de survenue d'une LMMJ [65, 66].

Les syndromes microdéletionnels de *NF1* qui emportent les régions flanquantes ont été décrits comme associés à un phénotype plus sévère, notamment sur le plan tumoral, il est rapporté un nombre important de neurofibromes et un risque de MPNST (Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumours) plus élevé. De façon intéressante, un des gènes de la région flanquante, *SUZ12* est un gène du PRC2, impliqué dans la di ou triméthylation de l'histone H3K27, et il est fréquemment altéré dans les LMMJs [67].

LMMJ syndromique liée au syndrome CBL (CBL-LMMJ)

Les CBL-LMMJ peuvent avoir une présentation agressive ou au contraire spontanément résolutive [26] mais certaines développent une vascularite plus tard [68, 51]. Ces LMMJ ont un sex ratio en faveur des filles [69].

Les LMMJ à *CBL* s'accompagnent d'une perte d'hétérozygotie somatique au niveau de la région 11q-qter qui émerge par une isodisomie uniparentale acquise sans que la raison en soit bien comprise.

Les variants décrits, de type faux-sens ou délétion in-frame touchent principalement le domaine RING-finger ou sa région adjacente, et pourrait avoir un effet dominant négatif en conservant une fixation aux RTK activés sans induire leur dégradation [46].

Il existe un hotspot mutationnel pour le variant p.Y371H qui est plus fréquemment retrouvé. Les études fonctionnelles montrent une élévation des récepteurs EGFR phosphorylés (pEGFR), donc une inhibition de la clairance des RTK, associée à diminution de la capacité de CBL : p.Y371H à poly-ubiquitiner pEGFR aux LMMJ [46, 51].

LMMJ syndromique liée au mutation GATA2

GATA2 est un facteur de transcription, qui possède deux domaines Zinc Finger (ZF1 et ZF2), impliqué dans l'hématopoïèse. Des mutations germinales dans ce gène sont responsables de différents syndromes de prédispositions aux hémopathies malignes et à des infections opportunistes, en particulier fongique, à mycobactéries et à HPV [70, 71].

En particulier, des variants perte de fonction ont été retrouvés dans les patients atteints de LMMJ [72, 70].

Les LMMJ sporadiques

Les LMMJ sporadiques sont fréquemment mutées *PTPN11*, *KRAS*, ou *NRAS*.

Les LMMJ somatiques *PTPN11* ont la réputation d'être de mauvais pronostic. Dans l'étude de Yoshida et al., chez 71 patients avec LMMJs sporadique, la survie globale à 5 ans était de 25 % chez les mutés *PTPN11* contre 64 % chez les autres, mutés *NRAS* et *KRAS* [73].

Les LMMJ mutées *NRAS* et *KRAS* sont quant à elles hétérogènes. Certains patients porteurs de mutation *NRAS* guérissent spontanément, et dans une moindre mesure les patients mutés *KRAS* [74, 75, 76].

D'autre part, une entité appelé RAS-associated Autoimmune Leukoproliferative Disorder (RALD) a été décrite [77]. Il s'agit d'une lymphoprolifération B non maligne, avec hépatosplénomégalie, des adénopathies, une hypergammaglobulinémie, une monocytose. Les patients avaient pour certains des auto-anticorps tels que des anticoagulants circulants de type lupique, des anti-cardiolipides, et des

facteurs anti-nucléaires positifs.

Le substratum moléculaire du RALD est une altération des exons 12, 13 et 61 de KRAS ou NRAS, soit les mêmes codons que ceux dans les LMMJ.

Ainsi la diversité des LMMJ ne peut s'expliquer uniquement par leur seule mutation initiatrice, aussi, d'autres facteurs comme les mutations additionnelles ou les altérations épigénétiques jouent également un rôle pronostique.

Facteurs de risque par mutations additionnelles

Monosomie 7

La monosomie 7 est fréquemment rapportée, en particulier dans les LMMJ associées à KRAS, où elle est observée dans environ 25 % des cas [78]. Sa valeur pronostique est néanmoins débattue :

Dans l'étude de Manabe et al. [79] 6 patients sur 27 atteints de LMMJ avaient un caryotype anormal (4 avaient une monosomie 7, 1 avait une trisomie 21 et le dernier une inversion du 2). A 4 ans, ces patients étaient tous décédés, tandis que la survie à 4 ans chez les patients sans anomalie caryotypique était de 81.8 %. Cependant, ce résultat n'a pas été confirmé par d'autres études plus larges [80, 81].

Mutations additionnelles dans la voie RAS

En plus des mutations initiatrices, d'autres mutations additionnelles vont concerner la voie RAS. Historiquement, les variants de la voie RAS étaient décrits comme mutuellement exclusifs.

Cependant, il s'avère au contraire que les mutations additionnelles vont s'accumuler dans les gènes de la voie RAS. Elles concernent les gènes canoniques de la voie RAS (voir figure 3.1), ou bien des régulateurs tels que PDE8A, qui empêche l'inhibition de RAF1 par phosphorylation, ou bien RAC2 qui agit en activant la voie PI3K-PDK1-AKT et mTORC2. Le gène SETBP1 a été aussi retrouvé muté, et a mutation récurrente p.Gly870Ser réduit l'activité de PP2A, une phosphatase dont les cibles sont les membres de la voie RAS-MAPK comme RAF-1 [82].

La présence de ces variants additionnels dans la voie RAS s'accompagne ainsi d'un pronostic défavorable [83].

Mutations additionnelles dans la voie du polycomb

Les gènes du PRC2 :

A partir des travaux sur la drosophile par Lewis et al., deux groupes majeurs de gènes qui assurent la régulation de l'expression des gènes ont été identifiés.

D'un côté les protéines du groupe Trithorax (trxG), activateurs transcriptionnels, de l'autre les protéines du groupe Polycomb, represseurs transcriptionnels. Ces protéines agissent sur le plan épigénétique en modulant l'état de compaction de la chromatine pour activer ou inactiver certains gènes. Grâce notamment à ces complexes, une diversité de profil d'expression génétique va pouvoir émerger,

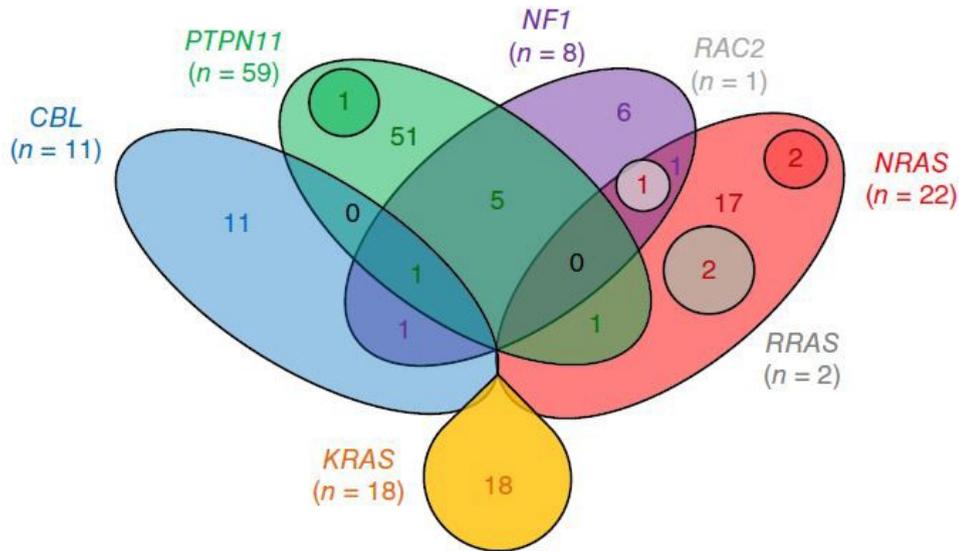


Figure 3.1 – Mutations non exclusives dans les LMMJ

Diagramme de Venn, montre la coexistence de plusieurs mutations dans les gènes canoniques de la voie RAS. Chez 3 patients, schématisés par des cercles de même couleur à l'intérieur de l'ensemble des mutations *PTPN11* et *NRAS*, coexistent des doubles mutants *KRAS*. Chez 3 autres patients, dans les ensembles en gris, des variants *RRAS* sont aussi présents. Caye et al. Nature genetics 2015 [83].

conduisant à différents sous-types cellulaires, bien que leurs génomes soient pourtant identiques.

Ainsi ces complexes vont jouer un rôle majeur dans le contrôle de la différenciation cellulaire, de l'auto-renouvellement, et le maintien des lignées cellulaires. Aussi, les mutations dans ces gènes vont donner lieu à des anomalies du développement, ou bien être impliquées dans l'oncogenèse, soit en réactivant des oncogènes ou soit en réprimant certains suppresseurs de tumeurs [84].

Les protéines du groupe Polycomb ont été identifiées chez la Drosophile. Ils ont un rôle régulateur dans la segmentation du corps en tant de répresseurs des gènes homéotiques.

Ils existent 2 complexes majeurs chez les mammifères :

Les Polycomb Repressive Complex (PRC) 1 et 2

Le premier, le PRC1, mono-ubiquitine la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub) via ses enzymes ubiquitine ligases Ring1A et Ring1b. Le second di ou tri-méthyle la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me2/3), via ses sous-unités catalytiques Ezh1 et Ezh2.

Le PRC1 est constitué de 4 sous-unités principales :

PCGF4/BMI1, PCGF2/MEL18, PHC, CBX et une H2A mono-ubiquitylases : RING1A ou RING1B. La marque H2AK119ub1 apposée induit de la compaction de la chromatine.

Le PRC2 est constitué de 4 sous-unités (voir figure 3.2) : SUZ12 (suppressor of zeste 12 homolog), EED (Embryonic Ectoderm Development), une méthyltransférase : EZH1 ou EZH2 (enhancer of zeste Homolog 2) et RbAp46/48. Il est recruté au niveau d'îlots CpG non méthylé pour apposer la marque H3K27me3 [85].

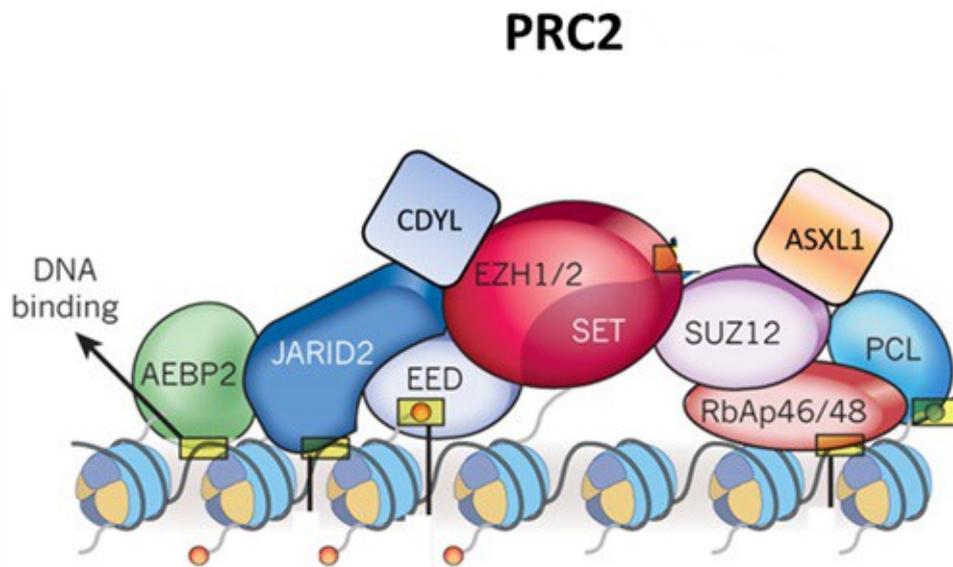


Figure 3.2 – Le PRC2 (Polycomb Repressive Complex de type 2) et ses sous-unités).

Le PRC2 participe à la régulation de la transcription par son rôle dans le contrôle de la compaction de la chromatine, en apposant la marque d'histone H3K27me3. Cette marque va entraîner une compaction de la chromatine, et donc une inhibition de la transcription des gènes cibles. Adaptée d'après Margueron et al. [86]

La sous-unité CBX du PRC1 reconnaît la marque H3K27me3 apposée par le PRC2. Il est donc supposé que le PRC1 agit en aval du PRC2. Cependant certains gènes sont des cibles du PRC2 sans qu'ils portent la marque H2AK119ub, d'autres sont affectés par le PRC1 sans être ciblés ensuite par le PRC2 [87].

EZH1 et *EZH2* s'expriment de manière différente : *EZH1* est exprimé dans les cellules différenciées ou en division, tandis que *EZH2* s'expriment uniquement dans les cellules en division. L'activité méthyl-transférase de PRC2-*EZH1* est comparativement plus faible que celle de PRC2-*EZH2*, ce qui suggère que l'établissement de la marque H3K27me2/3 serait du ressort de PRC2-*EZH2*, tandis que PRC2-*EZH1* jouerait plutôt un rôle de maintenance [88, 87].

D'autres composants associés du PRC2 ont été décrits comme AEBP2, JARID2, PCL, CDYL.

AEBP2 est une protéine à doigts de Zinc qui augmente l'activité du PRC2 [89].

JARID2 est une protéine de la famille des Jumonji, qui joue un rôle dans la modulation de l'activité du PRC2, tantôt décrit que répresseur du PRC2 [90, 91], tantôt comme un activateur sous certaines conditions biochimiques [92].

Pcl interagit avec le PRC2 à travers EZH2, SUZ12 et les chaperonnes d'histones RbAp46/48 [93].

CDYL (Chromodomain Y-Like protein) est une protéine de forte affinité pour la marque H3K27me_{2/3} qui interagit directement avec EZH2 [94].

ASXL1 (Additional sex combs like 1), est un homologue du gène *Asx* de la drosophile, est un co-facteur de l'acide rétinoïque qui joue un rôle régulateur des gènes *Hox*.

Ainsi, en résumé, le PRC2 permet la modification post-traductionnelle de l'histone H3, en apposant la marque H3K27me₃ (tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3). Cette marque épigénétique va entraîner un recrutement de protéines à bromodomaine, et in fine aboutir à une répression transcriptionnelle des gènes cibles.

LMMJ et PRC2

Le PRC2 est fréquemment altéré dans les LMMJ. La délétion 7 ou 7q vue précédemment, est responsable de l'haploinsuffisance d'*EZH2*. D'autres CNVs sont aussi retrouvés dans les gènes *SUZ12*, *AEBP2*, *CDYL*, *JARID2*.

Des mutations d'*ASXL1* ont été décrites et concernent surtout l'exon terminal du gène, c'est-à-dire la perte du domaine fonctionnel PDH (Plant Homéodomain). La présence d'un tel hotspot mutationnel, et l'absence de mutations en amont de la région terminale est en faveur d'un mécanisme type gain de fonction ou dominant négatif [95, 96, 83].

Les mutations d'*ASXL1* causent la perte de la méthylation des H3K27 par défaut de recrutement des PRC2 [97].

Anomalies de la méthylation de l'ADN dans les LMMJs

Les facteurs pronostiques décrits précédemment ne permettent toutefois pas d'expliquer la diversité d'évolution des LMMJ.

En 2010, Bresolin et al. [98] ont montré des différences dans le profil d'expression génique entre les LMMJ agressives, proches des Leucémies Aigüe myéloïdes, et les autres de meilleur pronostic.

Cette observation a mis en évidence le rôle important de la régulation de la transcription génique pour affiner le pronostic des LMMJ.

D'autre part, de manière générale, la transformation maligne est associée à des anomalies épigénétiques. En particulier, l'existence d'une hypométhylation globale du génome couplée à une hyperméthylation spécifique de certaines régions du génome, notamment celles associées à des gènes suppresseurs de tumeurs, est considérée comme une marque de fabrique du cancer.

Cet aspect a été étudié dans les LMMJ, et il existe en effet des régions récurrentes d'îlots CpG hyperméthylées dans certaines d'entre elles :

4 gènes en particulier (bone morphogenetic protein 4 [BMP4], calcitonin related polypeptide alpha [CALCA], cyclin dependent kinase inhibitor 2B [CDKN2B], and retinoic acid receptor beta [RARβ]) présentent des îlots CpG fréquemment méthylés [99, 100].

En faisant un score de méthylation de ces gènes, lorsque l'on attribue 1 point pour chaque gène hyperméthylé, la survie à 5 ans était de 69 % pour le groupe avec le score à 0 contre 8 % dans le groupe avec un score à 3-4 [100]. D'autres hyperméthylations dans les promoteurs ou les enhanceurs de gènes suppresseurs de tumeurs ont été observés :

RASA4 (the Ras p21 protein activator 4) [101], AKAP12 (A-kinase anchoring protein 12) qui inhibe la voie de la protéine kinase C. [102], et Kruppel like factor 1 (KLF1) un régulateur important dans la synthèse de l'hémoglobine [103].

Le phénotype hyperméthylé est donc un élément de mauvais pronostic, tandis que l'absence de méthylation aberrante pourrait être un bon indicateur pour identifier les LMMJs qui ne nécessitent pas de greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Aussi, la EWOG-MDS a proposé une classification en 3 classes de niveau de méthylation : faible, intermédiaire, élevé dans une cohorte de 167 patients [104]

Le groupe faiblement méthylé regroupe des patients à l'évolution favorable, dont en majorité des mutations *NRAS*, *CBL* et des patients atteints du syndrome de Noonan. Le groupe intermédiaire est fortement corrélé avec des mutations *KRAS* et une monosomie 7.

Enfin le groupe fortement méthylé comporte les patients avec une évolution défavorable et des LMMJ particulièrement agressives avec surtout des mutations *PTPN11*.

L'étude a aussi mis en évidence une hyperexpression des DNA méthyltransférases DNMT1 et DNMT3B, et de la marque répressive d'histone H3K27me3.

Cette classification a été reprise par une équipe de l'université de Californie chez 39 patients [105].

L'équipe japonaise de l'université de Nagoya, en utilisant une analyse bio-informatique de cluster non supervisé chez 106 enfants, établi seulement 2 catégories de profil de méthylation.

Les patients avec un profil hyperméthylés sont ceux qui présentent les facteurs de mauvais pronostic classiques des LMMJs : diagnostic plus tardif, hémoglobine foetal augmentée, thrombopénie, mutation *PTPN11* /*NF1* [106], hyperexpression de *LIN28B* [107].

LIN28B

Préambule

LIN28B est un oncogène fœtal qui joue un rôle régulateur dans l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires, fœtales et cancéreuses. Il a été trouvé surexprimé dans les LMMJs.

Initialement, l'homologue de LIN28B appelé *Lin28*, a été décrit comme intervenant dans le contrôle du développement du ver *C. elegans* (Ambros et Horvitz, 1984) [108]. La perte de fonction de ce gène entraîne une accélération du développement post-embryonnaire de *C. elegans*, qu'on appelle une hétérochronie.

Chez l'Homme et les mammifères, il existe 2 homologues à *Lin-28* de *C. elegans* : LIN28A (ou simplement LIN28), et LIN28B.

Inhibition de la maturation des miRNAs par LIN28A/B

LIN28A/B sont des protéines se liant à l'ARN qui inhibent la maturation des miRNAs de la famille *let-7*. La liaison à l'ARN se fait grâce à deux motifs : un Cold Shock Domain (CSD), et un motif en doigt de zinc de type CCHC (Cys-Cys- His-Cys) [109].

Les miRNAs sont des petits ARNs non codants d'environ 22 nucléotides. Ils jouent le rôle de répresseurs par le biais d'une inhibition post-transcriptionnelle.

Let-7 est transcrit par la RNA polymérase II et va donner naissance à un transcrit primaire (Pri-*let-7*). Il présente un motif en épingle à cheveux. Ce pri-*let-7* sera reconnu par le complexe Droscha/DGCR8 à l'intérieur du noyau. Droscha va cliver pri-*let-7* et celui-ci sera dirigé vers le cytoplasme par un exportin EXP5. Normalement, le pre-miRNA est clivé par Dicer pour former un ARN double brin qui va servir de guide. Ce guide est chargé sur une protéine de classe Argonaute (AGO) pour former le complexe RISC. Puis, par complémentarité des bases, le complexe RISC-miRNAs mature se fixe sur des ARN messagers au niveau de séquences consensus situées en 3'UTR. Cette liaison entraîne soit la dégradation de l'ARNm cible soit l'inhibition de sa traduction [110].

LIN28A/B vont jouer un rôle inhibiteur en empêchant la biosynthèse de ces miRNAs (voir figure 3.3).

LIN28A agit en se fixant à des séquences GGAG présentes dans la boucle terminale de pre-*let-7*. Ceci permet l'oligo-uridylation de pre-*let-7* par recrutement de TUT4/7. Lorsque les pre-*let-7* sont oligo-uridylés en 3', c'est-à-dire qu'une queue d'environ 14 uridines est rajoutée en 3', Dicer est incapable de les cliver, et ils sont donc dégradés par une exoribonucléase appelée DIS3L2 [111, 112, 113, 114].

LIN28B inhibe aussi la biosynthèse de *let-7* mais par un mécanisme indépendant des TUTases. Il possède une séquence de localisation nucléolaire (NoLS). Il se lie à pri-*let-7* et le séquestre dans le nucléole. Cependant, Suzuki et al. [115] ont rapporté que LIN28B interagit avec DIS3L2, et donc pourrait participer aussi à l'inhibition de la maturation de pre-*let-7* par un mécanisme dépendant des TUTases. De même, il est possible que LIN28A agisse aussi sur pri-*let-7* lorsqu'il est méthylé sur la lysine 135 par SETD7/9. La séquence qui jouxte cette lysine est

similaire au NoLS de LIN28B, et lorsqu'il est méthylé, LIN28A a une affinité plus importante pour pri-let-7. Ceci laisse à penser que LIN28A est aussi capable de séquestrer pri-let-7 dans le nucléole [116].

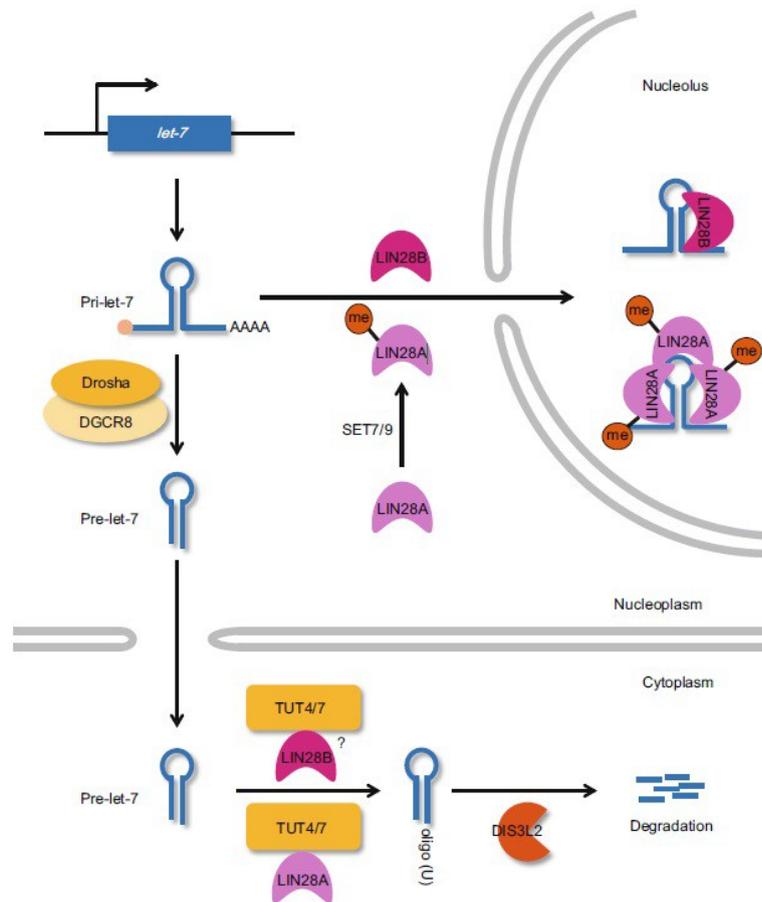


Figure 3.3 – Mode d'action de LIN28A et LIN28B.

LIN28A et LIN28B ont un rôle régulateur négatif dans la biosynthèse des let-7.

LIN28B agit sur pri-let-7 en le séquestrant dans le nucléole. Son action pourrait aussi se faire via la voie des TUTases, mais cela reste à confirmer.

LIN28A agit essentiellement sur pre-let-7 en recrutant TUT4/7. Il se fixe sur des séquences GGAG, et se multimérise. Ceci permet l'oligo-uridylation de pre-let-7 et sa dégradation par DIS3L2. LIN28A pourrait aussi se fixer sur pri-let-7 et le séquestrer dans le nucléole lorsqu'il est méthylé en K135 par SEDT7/9. Lee et al. [110].

Activation des cibles des let-7 par LIN28A/B

Les principales cibles des let-7 régulés par *LIN28A/B* sont *HMGA2*, *Igf2bp1*, *Myc* et *K-Ras* (voir figure 3.4) [117].

HMGA2 (High Mobility Group AT-hook 2) est une protéine non-histone qui intervient dans la régulation de la transcription par une action au niveau du repliement de chromatine. Son rôle est très large, elle participe aussi à la progression dans le cycle cellulaire, à la prolifération, la différenciation cellulaire, et la sénescence [118, 119].

Igf2bp1 (Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1) est une mRNA-binding-protein, dont la perte de fonction est responsable d'une inhibition de la croissance chez la souris, avec des individus plus petits à l'âge adulte [120] : un phénotype qui rappelle celui des souris KO pour *LIN28A*, qui ont une taille réduite [121]. De manière générale, on sait que la suppression de *LIN28A* et *LIN28B* augmente la sensibilité à l'insuline, la captation de glucose, et il semblerait que l'axe *LIN28A/B*-let-7 participe au métabolisme du glucose au travers de la voie Insulin-PIK3-mTOR [122].

MYC est une famille de facteurs de transcription majeure qui régule la transcription d'environ 15 % du génome [123]. Il va intervenir dans la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme, l'apoptose, la différenciation et l'adhésion cellulaire [124].

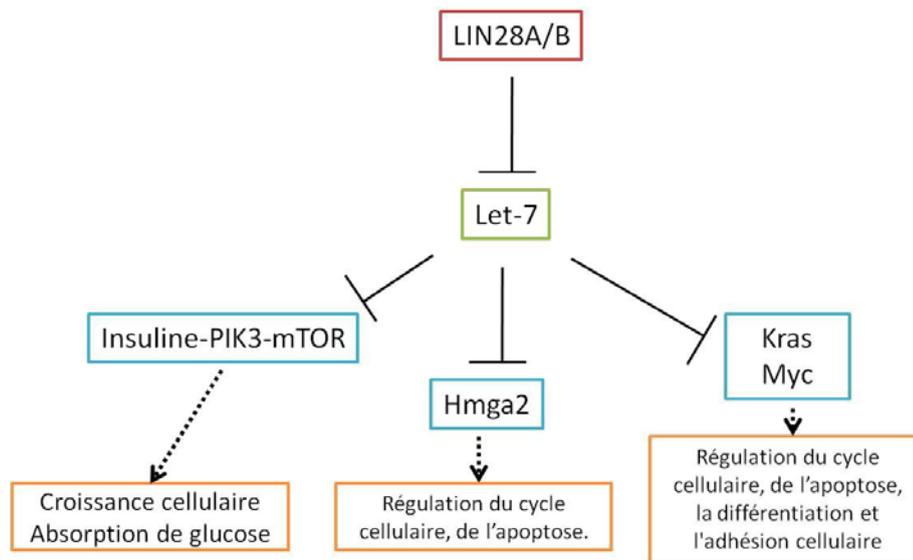


Figure 3.4 – Cibles biologiques de *LIN28A/B*.

Expression de LIN28 au cours de l'hématopoïèse

Comme vu précédemment, *LIN28A/B* contribuent à l'inhibition des miRNAs de la famille let-7. En conséquence, ils suivent une cinétique d'expression inversement proportionnelle [125]. *LIN28A/B* sont exprimés de manière précoce au cours du développement, puis réprimés dans la majorité des tissus de l'adulte. Ils suivent des schémas d'expression différents : *LIN28A* est exprimé dans les cryptes intestinales, les muscles, le coeur, les testicules et l'ovaire. *LIN28B* s'expriment dans le

foie foetal, le système hématopoïétique, et le cerveau [126].

Pour ce qui nous intéresse, *LIN28B* joue un rôle important dans le système hématopoïétique foetal. Il est exprimé à des niveaux élevés dans les progéniteurs lymphoïdes et les cellules souches hématopoïétique fœtales où il promeut leur auto-renouvellement. Son expression va progressivement décroître après la naissance, alors que s'élève les niveaux de *let-7*. Il va jouer un rôle de commutateur entre l'hématopoïèse foetale et l'hématopoïèse adulte (voir figure 3.5) [127]. L'expression ectopique de *LIN28B* dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) adultes induit un phénotype semblable aux CSH fœtales [128].

Il est aussi impliqué dans la régulation de l'expression de l'hémoglobine foetale chez l'être humain. En comparant les réticulocytes issus de sang de cordon avec des adultes, les niveaux bas d'HbF ont été corrélés à des taux élevés de *let-7* [129]. Cette hausse est concomitante avec une diminution de *LIN28B* [130]. L'ARNm du gène foetale de la γ globine, qui entre dans la composition du tétramère $\alpha_2\gamma_2$ qu'est l'HbF, est surexprimé lorsque *LIN28B* est lui-même surexprimé [130]. La surexpression de *LIN28B* entraîne aussi la répression d'un gène, *BCL11A*, connu comme activateur de la γ globine [131], par un mécanisme dépendant de *let-7* [130].

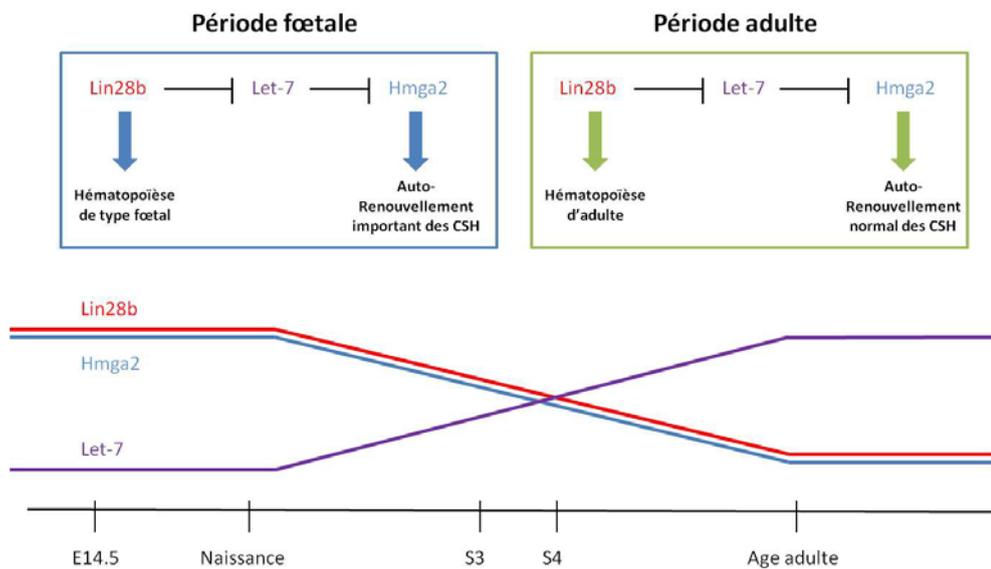


Figure 3.5 – Expression de *LIN28* au cours de l'hématopoïèse.

S3 : Semaines 3 post-natale, correspond au développement chez la souris. CSH : Cellule Souche Hématopoïétique. Adaptée d'après Copley et al. [127].

Rôle oncogénique de *LIN28B*

LIN28B est considéré comme un oncogène foetal, il est surexprimé dans les stades précoces de l'embryogenèse, puis éteint dans la plupart des tissus de l'adulte [126, 117]. Dans les cellules cancéreuses, *LIN28B* est fréquemment réactivé en particulier dans les cancers pédiatriques, et de manière préférentielle par rapport à *LIN28A* [132]. On le retrouve notamment surexprimé dans les medulloblastomes, les tumeurs rhabdoïdes, les tumeurs de Wilms ou les neuroblastomes [132]. Sa contribution à l'oncogenèse serait multiple :

L'inhibition de *LIN28* par siRNA diminue la croissance cellulaire et augmente

l'apoptose dans les cellules souches embryonnaires, ce qui suggère un rôle oncogénique [133].

Les protéines HMGA inhibés par les let-7 jouent des rôles oncogéniques comme l'induction de la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, et des anomalies de la réparation de l'ADN [119].

Dans le métabolisme du glucose, *LIN28B* pourrait favoriser la glycolyse anaérobie par rapport au métabolisme aérobie. Ce changement fréquemment observé dans les cellules cancéreuses s'appelle « l'effet Warburg » [121, 122].

Surexpression de LIN28B dans les LMMJs

LIN28B a été retrouvé surexprimé dans les LMMJs dans une seule publication (Helsmoortel et al.) [107]. En comparant l'ARN issu des cellules mononuclées de 44 LMMJs avec 7 enfants sains contrôles par microarray, *LIN28B* ressortait comme différentiellement surexprimé dans la population LMMJ.

Cette surexpression était corrélée à l'élévation de l'HbF et l'absence de monosomie 7. De plus, les patients avec un niveau d'expression de *LIN28B* supérieur étaient diagnostiqués plus tardivement, et avaient une thrombopénie plus marquée. Enfin, les miRNAs de la famille let-7, en particulier Let-7g, let-7e, et let-7a était inversement corrélée à l'expression de *LIN28B*, de façon consistante avec les données de la littérature précédemment exposées. Bien qu'une activation de *BCL11A* n'ai pas été notée dans cette étude, d'autres gènes comme *HBBP1*, *HBG1*, *HBZ*, *HBQ1*, qui participent à la synthèse de l'hémoglobine fœtale furent retrouvés surexprimés. La surexpression de *LIN28B* était associée à une diminution de la survie à 5 ans, et la survie sans événement.

Chapitre 4

CD90 (THY-1)

Préambule

CD90 (Cluster of Differentiation 90) ou THY1 (Thymocyte differentiation antigen 1) est un marqueur utilisé en cytométrie de flux pour identifier les cellules souches hématopoïétiques. Il a été constaté récemment une expression aberrante de ce marqueur dans une fraction de cas de LMMJs, ce qui est l'objet de ce travail de thèse [134].

CD90 a été découvert pour la première fois en 1964 par Reif et Allen [135]. Un antisérum dirigé contre cet antigène était capable de lyser les thymocytes murins. Elle est codée par le gène *THY-1* située en 11q23.3, sur le brin reverse. Il existe 5 transcrits codants, qui possèdent chacun 4 exons. Il y a deux transcrits qui diffèrent par leur 5'UTR, codent pour la même protéine de 111 acides aminés (25 kDa).

Fonctions biologiques de CD90

Les fonctions de CD90 restent à ce jour mal connues. Il est globalement considéré comme un marqueur de cellule souche, et jouerait un rôle important dans l'hématopoïèse, l'inflammation, la cicatrisation, l'adhésion cellulaire, la croissance neuronale et la différenciation cellulaire [136, 137, 138].

Structure du CD90

Structurellement, CD90 est une glycoprotéine de surface, une protéine à ancre GPI [136]. Cette dernière a 3 sites de N-glycosylation, deux ponts disulfures et un site de lipodation [139]. C'est l'une des plus petites protéines de surface, elle compte seulement 111 AA (25 kDa) avec un domaine immunoglobuline [140].

Les GPI sont des glycolipides qui servent d'ancres à des protéines de surface en se liant à leur extrémité C-terminal au terme d'une modification post-traductionnelle. Les protéines à ancre GPI ont une séquence N-terminal d'adressage au Réticulum endoplasmique. A leur extrémité C-terminal, une séquence consensus signale le site d'attachement au GPI.

Rôle dans l'adhésion cellulaire et la mécanotransduction

Il a été récemment proposé que THY-1 participe à la mécanotransduction du signal intégrine-matrice extracellulaire, ou à des interactions inter-cellulaires en trans ou en cis [141] (voir figure 4.1).

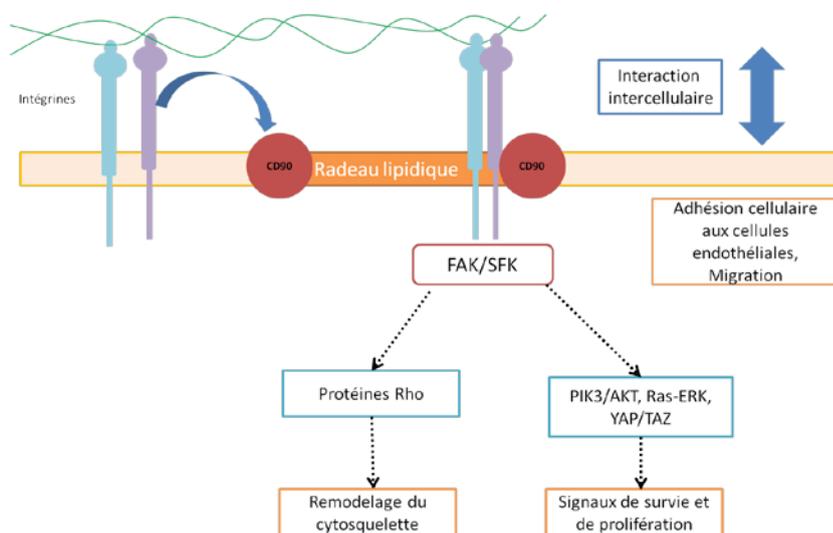


Figure 4.1 – Modes d'action hypothétiques de CD90.

CD90 serait impliqué dans la signalisation par les intégrines et le syndecan4, avec un rôle possible de potentialisation du signal en recrutant ses partenaires au niveau des radeaux lipidiques. Une activation du cytosquelette d'actine par la signalisation RhoA a été mise en évidence chez les astrocytes [141]. La voie intégrin/FAK/SFK est aussi connue pour être capable d'activer Ras-ERK, PI3K/AKT, YAP/TAZ [142].

Figure réalisée d'après Hu et al. [141] et Cooper et al. [142]

On sait que THY-1 est un ligand des intégrines de surface : les intégrines $\alpha v \beta 3$ [143, 144], $\alpha v \beta 5$ [145], $\alpha 5 \beta 1$ [146], $\alpha c \beta 2$ [147], $\alpha M \beta 2$ [148].

Les intégrines sont des CAM (Cell Adhesion Molecules) qui permettent l'interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire. Elles forment un hétérodimère (sous-unités α et β) transmembranaire qui trouve son ligand dans l'espace extracellulaire. Leur partie intracytoplasmique est quant à elle en lien avec le cytosquelette [149].

CD90 a aussi pour co-recepteurs : le syndecan-4, la thrombospondine, les glycanes sulfatés, le CD97, un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G.

L'interaction entre CD90 et les intégrines est de faible affinité, et il est supposé qu'une concentration de THY-1 et de ces partenaires soit nécessaire pour transduire un signal [141]. Or CD90 est située dans des microdomaines de radeaux lipidiques non cavéolaires [140], et il est donc possible qu'il forme un complexe focal Thy-1-Intégrin-syndecan4 au niveau des radeaux lipidiques [141].

Les intégrines sont connus pour faire le lien avec le cytosquelette d'actine et activer FAK(Focal Adhesion Kinase)/SFK(SRC Family Kinase). L'activation des protéines FAK/SFK serait capable d'induire différentes voies de signalisation comme RhoA [141], Ras-ERK, PI3K/AKT, YAP/TAZ [142].

Expression au cours de l'hématopoïèse

Chez l'Homme, le CD90 sert à caractériser la cellule souche hématopoïétique qui a un phénotype CD34⁺ CD38⁻ CD90⁺ Lin⁻ CD45RA⁻ [150]. Il est rapidement perdu au cours de l'ontogénèse normale (voir figure 4.2).

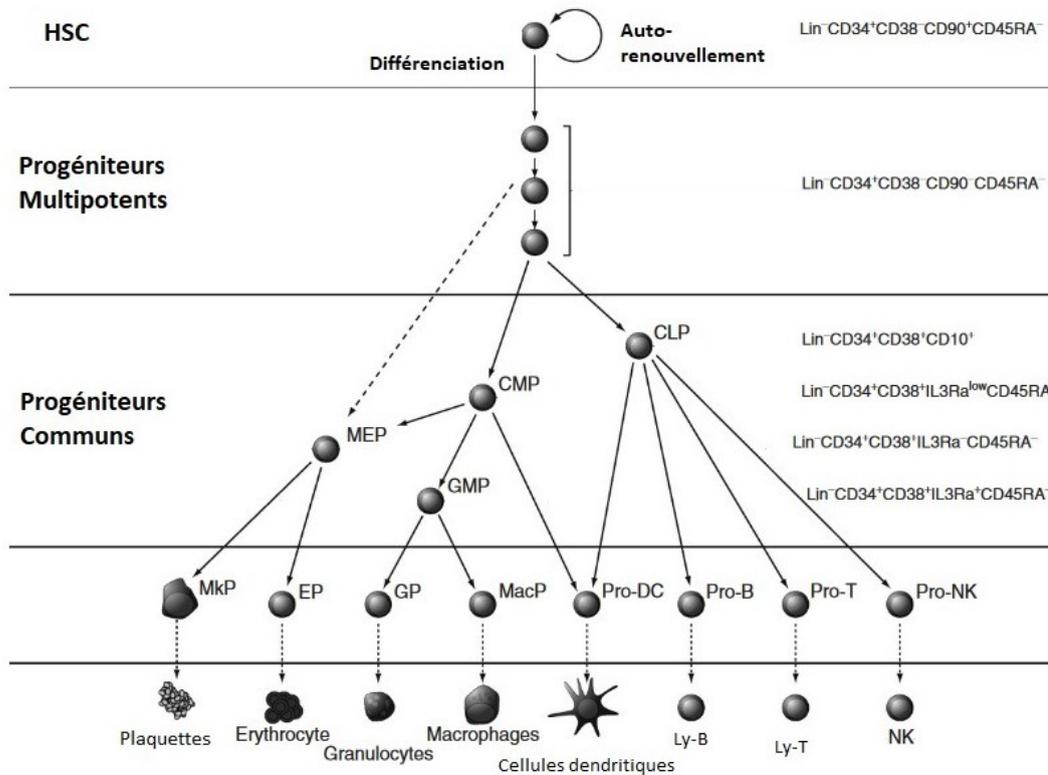


Figure 4.2 – Hématopoïèse et immunophénotypage chez l'être Humain.

HSC : Cellule Souche Hématopoïétique. CMP : Progéniteur Commun Myéloïde. CLP : Progéniteur Commun Lymphoïde. GMP : Progéniteur Commun Granulocytaire monocytaire. MEP : Progéniteur commun Mégacaryocytaire Érythroblastique. Mkp : Progéniteurs des Mégacaryocytes. EP : progéniteurs érythroïdes. GP : Progéniteurs des granulocytes. MacP : Progéniteurs des Macrophages. Ly-T/B : Lymphocytes T/B. Pro-DC/T/B : Progéniteurs des cellules dendritiques/lymphocytes T/B. D'après Seita et al. [150].

Expression du CD90 dans les LMMJ

Caye et al. 2019 [134] ont remarqué une expression aberrante du CD90 dans les cellules CD34⁺CD38⁻ de la moelle osseuse de patients atteints de LMMJ en cytométrie en flux. Elle persistait dans les cellules CD34⁺CD38⁺. Dans les progéniteurs CD34⁺CD38⁺, l'expression aberrante du CD90 était majoritairement présente dans des cellules aux phénotypes proche des GMP (Progéniteur commun Granulocytaire Monocytaire) (voir figure 4.3).

Cependant, ces constatations reposaient sur un faible nombre de patient, en raison de la faible quantité de moelle osseuse disponible pour réaliser une étude en cytométrie en flux. Cela était dû à la rareté de la pathologie. Afin de poursuivre l'analyse du CD90, le choix a été fait de mesurer l'ARNm du CD90 en rétrospectif sur les échantillons des patients LMMJ conservés au laboratoire.

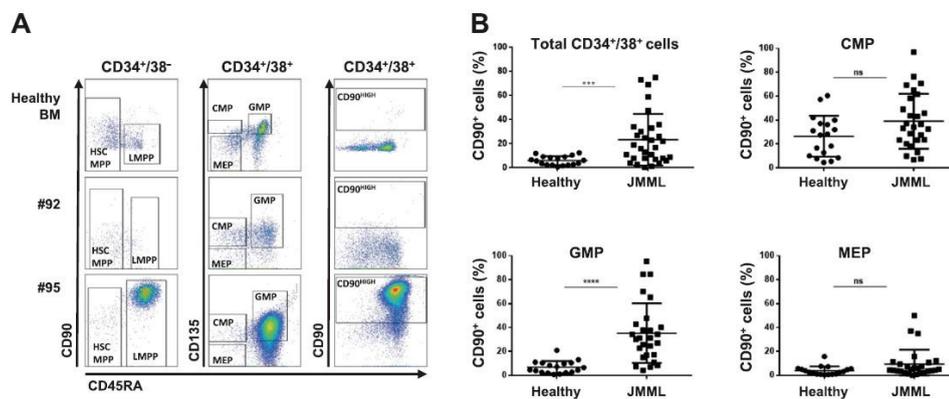


Figure 4.3 – CD90 est surexprimé dans un sous-type de LMMJ.

A : Représentation graphique des résultats de cytométrie en flux de la moelle de 2 patients atteints de LMMJ (#92 qui présentent une LMMJ mutée NRAS, et #95 une LMMJ mutée PTPN11) par rapport à une moelle d'enfant sain. Les trois colonnes représentent respectivement de gauche à droite les fractions CD34⁺CD38⁻ et CD34⁺CD38⁺. En abscisse l'expression du CD45RA, en ordonnée celle du CD90.

B : Pourcentage de cellules qui expriment CD90/Thy-1 en cytométrie en flux, comparaison entre moelle saine et moelle des patients atteints de LMMJ, en fonction des différentes population de progéniteurs hématopoïétiques. D'après Caye et al. 2019 [134].

Chapitre 5

digital droplet PCR (ddPCR)

Préambule

Afin d'entreprendre l'étude de l'expression de l'ARNm du CD90, en raison de la faible quantité de matériel disponible, nous avons fait le choix d'utiliser la PCR digitale. Les avantages de cette technique sensible, et peu consommatrice en acides nucléiques sont détaillés ici.

Principe de la digitale PCR

La digital droplet PCR (ddPCR) est une méthode de quantification absolue des acides nucléiques cibles. On peut diviser cette technique en 3 étapes :

Le partitionnement, l'amplification, et la détection.

On commence par réaliser un mix de PCR classique, qui contient tampon de réaction, primers, polymérase et ADN d'intérêt. Ensuite, une émulsion « eau dans l'huile » va permettre de répartir les acides nucléiques dans les gouttelettes formées. La répartition des ADN cibles dans ces gouttelettes suit une répartition qui peut être approximée par la loi de Poisson.

La seconde étape de la technique est l'amplification. Il s'agit d'une PCR classique avec 20 à 40 cycles de dénaturation des deux brins d'ADN, hybridation des primers antiparallèles aux extrémités de la séquence d'intérêt, et enfin une élongation à partir des primers par une DNA polymérase.

Enfin la dernière étape est la détection. Elle est possible grâce à un signal de fluorescence corrélé aux produits de PCR obtenus. La mesure se fait en passant les gouttelettes obtenues en fin de réaction dans un cytomètre de flux. Grâce au circuit micro-fluidique, les gouttelettes vont passer une à une devant un laser.

Il va être ainsi possible de connaître le nombre total de gouttelettes, ainsi que la présence ou l'absence d'un signal fluorescent dans chacune de celles-ci. En connaissant le nombre de gouttelettes totales et les proportions de positives et de négatives, on en déduit la concentration initiale en acide nucléique dans l'échantillon grâce à la loi de Poisson.

Il existe 3 applications principales à cette technologie :

La détection de CNV (Copy Number Variations), la détection d'évènements rares, et la quantification absolue. Pour cette étude, nous avons utilisé la quantification absolue sur du cDNA obtenu après Reverse transcription. La concentration en cDNA d'intérêt est normalisé avec celle d'un gène de ménage, ici GUSB.

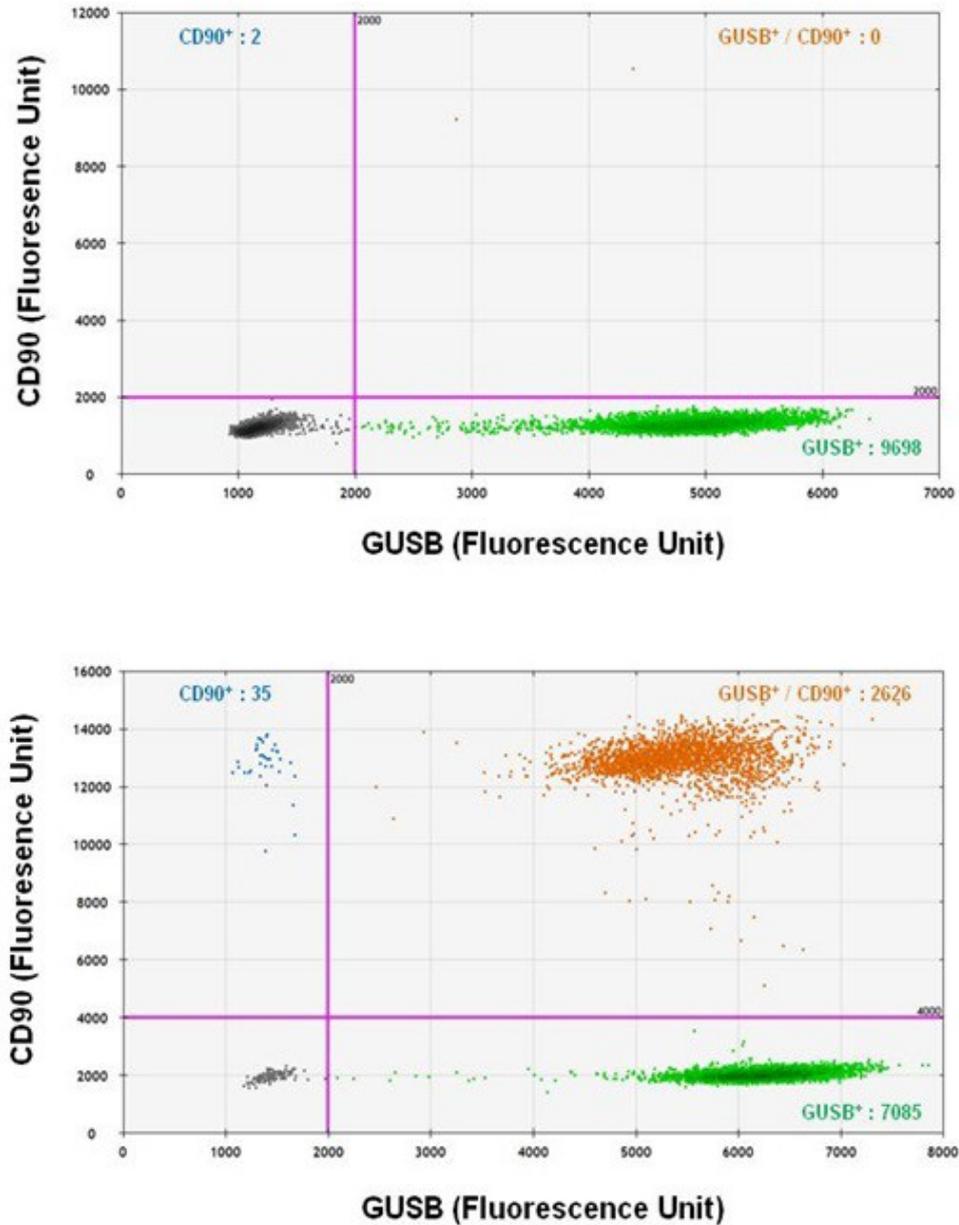


Figure 5.1 – Représentation graphique du logiciel Quantasoft[®] pour l'analyse de l'expression de *CD90* en prenant *GUSB* comme transcrit de référence.

Pour chaque graphe, les axes y et x indiquent les intensités de fluorescence dans le canal *CD90* (canal 6-FAM) ou *GUSB* (canal VIC), respectivement. On identifie les groupes positifs pour les gouttelettes *GUSB* en vert, pour *CD90* en bleu, double-positifs *GUSB* et *CD90* en orange, et double-négatifs en gris. Les graphiques supérieur et inférieur montrent des résultats représentatifs obtenus pour les patients #113 et #199, négatifs ou positifs pour l'expression *CD90*, respectivement.

Intérêt de la PCR digitale

En PCR, la répétition des cycles permet l'amplification exponentielle des acides nucléiques avec la génération de 2^n copies de molécules d'ADN où n est le nombre des cycles. Il s'agit d'un seuil théorique lorsqu'une variable que l'on nomme efficacité de la réaction est à 100%.

Cependant, l'accumulation de produits de PCR va progressivement entrer en compétition avec les amorces de PCR, et les produits de PCR vont avoir tendance à l'auto-hybrider. On va progressivement observer un infléchissement de la courbe réactionnelle. Une courbe réactionnelle de PCR suit d'abord une croissance exponentielle, puis linéaire, pour finalement atteindre un plateau de saturation.

En PCR quantitative, la fluorescence émise par les produits de PCR va être mesurée à chaque cycle. Lorsque l'intensité de fluorescence dépasse un seuil, fixée comme étant au-delà du bruit de fond, le nombre de cycle depuis le début de la réaction va être rapporté. On appelle ce nombre C_q (Quantification cycle) ou C_t (Cycle threshold).

Le C_q va se situer pendant la phase exponentielle de la réaction. Grâce à un calibrant que l'on va diluer à différentes concentrations, il va être possible de tracer une droite d'étalonnage et de faire correspondre au C_q de l'échantillon analysé le logarithme de sa concentration. La PCR quantitative va ainsi permettre de fournir une méthode de quantification relative des acides nucléiques. Cette méthode présente l'inconvénient de reposer sur le postulat que l'efficacité de la réaction de PCR est la même entre le calibrant et l'échantillon. Or, en cas de différence d'efficacité cela peut fausser significativement la quantification.

La PCR digitale possède en comparaison plusieurs avantages. Elle est d'une part plus sensible. Cela est dû à la séparation des séquences cibles d'ADN initialement : comme les séquences sont isolées, cela va réduire les phénomènes de compétitions entre les molécules d'ADN. Cela va aussi augmenter la tolérance aux inhibiteurs de la réaction de PCR.

Elle est aussi une méthode de quantification absolue :

La détection va avoir lieu à la fin de la réaction de PCR et ne dépendra pas d'une courbe de calibration. Elle s'affranchit donc d'un possible biais lorsque les efficacités du calibrant et de l'échantillon diffèrent.

Chapitre 6

Objectif de l'étude

Les LMMJ sont des hémopathies rares de l'enfant de mauvais pronostic. Il existe cependant une variabilité pronostique importante, entre des LMMJ indolentes, voire spontanément résolutive, et d'autres qui conduisent au décès malgré une greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Des facteurs pronostiques défavorables comme l'âge au diagnostic > 2 ans, une thrombopénie, et un taux d'hémoglobine fœtale élevé pour l'âge sont connus depuis longtemps. Le pronostic est également différent entre les LMMJ qui surviennent de manière sporadique, et celles liées à une atteinte germinale de la voie RAS. La mutation initiale, les mutations additionnelles ont aussi des impacts différents sur le pronostic. Plus récemment, trois équipes internationales ont identifié un sous-groupe de LMMJ agressives caractérisées par un profil d'hyperméthylation.

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier l'intérêt pronostique potentiel de ce marqueur CD90 dans le cadre de la pratique quotidienne d'un laboratoire centre de référence des LMMJ. Ainsi, nous avons étudié de manière rétrospective l'expression du CD90 en droplet digital PCR (ddPCR) dans l'ensemble de la cohorte de patients atteints de LMMJ adressés à l'hôpital Robert Debré.

L'objectif était de chercher des associations entre CD90 et les autres marqueurs pronostiques connus. En parallèle, nous avons voulu réévaluer l'intérêt pronostique de LIN28B, dans la mesure où il a été décrit dans une unique publication.

Deuxième partie
Matériels et Méthodes

Chapitre 7

Matériels et Méthodes

Patients

La cohorte comprenait au total 117 patients ayant reçu un diagnostic de LMMJ au laboratoire de génétique de l'hôpital Robert Debré (Tableau supplémentaire S2). Tous les patients répondaient aux critères LMMJ de consensus de l'OMS.

La plupart des patients présentaient une LMMJ sporadique avec des mutations PTPN11 somatiques (PTPN11-LMMJ ; n = 32), NRAS somatiques (NRAS-LMMJ ; n = 23), KRAS somatiques (KRAS-LMMJ ; n = 15), PTPN11 germinales (NS-LMMJ ; n = 12), CBL germinales (CBL-LMMJ ; n = 8), NF1 germinales (NF1-LMMJ ; n = 7), RRAS/RRAS2 somatiques (RRAS-LMMJ ; n = 5), d'autres gènes (n=10), et sans mutation identifiée (n=5). Des taux élevés d'hémoglobine fœtale (HbF) pour l'âge et/ou une surexpression de la transcription LIN28B ont été observés chez 51/117 patients.

Le diagnostic de LMMJ était basé sur les résultats cliniques et hématologiques, l'examen cyto-morphologique des frottis de sang et de moelle osseuse (BM), la croissance endogène in vitro des progéniteurs myéloïdes et le dépistage des mutations de l'ADN leucémique. Le dosage de l'hémoglobine fœtale (HbF) et le caryotypage ont été systématiquement réalisés en routine. La transcription de LIN28B a été mesurée par RT-PCR quantitative en temps réel. Tous les échantillons des enfants ont été obtenus après que les parents aient donné leur consentement éclairé par écrit. Cette étude a été approuvée par le comité de révision institutionnel de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) (IORG0003254) conformément à la déclaration d'Helsinki.

Ces patients étaient originaires de France métropolitaine et d'outre-mer, de Tunisie, d'Algérie ou du Brésil. Ils avaient déjà été explorés en routine dans le cadre de leur prise en charge et également étudiés dans de précédentes études.

Techniques

Extraction de l'ARN

Les prélèvements, faits sur EDTA ou Héparinate de Lithium, étaient issus de ponctions veineuses de sang périphériques et/ou des produits d'aspiration de moelle osseuse au moment du diagnostic.

L'ARN a été extrait de cellules mononucléaires à l'aide du miRNeasy Mini ou Micro Kit (Qiagen). Les concentrations ont été mesurées à l'aide d'un NanoDropOR (Thermo Scientific). L'ADNc a été obtenu par transcription inverse de 1 µg d'ARN avec des hexamers aléatoires, selon des procédures standards.

qRT-PCR

La RT-PCR quantitative en temps réel de LIN28B a été réalisée à partir d'un équivalent de 100 ng d'ARN en utilisant des procédures standards et un système de détection de séquence ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems). L'expression des transcrits LIN28B a été normalisée en utilisant comme référence GUS-B, un gène de ménage. Le changement relatif de l'expression de la transcription LIN28B a été déterminé en calculant le ΔCt ($Ct_{LIN28B} - Ct_{GUS}$) pour chaque échantillon. LIN28B était considéré comme surexprimé lorsque le $Ct_{LIN28B} - Ct_{GUS}$ était inférieur à 8.

droplet digital PCR

L'ARNm du *CD90* a été quantifié par ddPCR en utilisant GUSB comme transcript de référence. L'analyse a été réalisée à partir de 5 µl de ADNc, en utilisant le système de ddPCR par gouttelettes QX200 AutoDG (BioRad, Hercules, CA, USA) selon le protocole du fabricant.

Les sondes CD90 et GUSB ont été conçues par TaqMan Gene expression Assays (Life technology), et marquées par fluorescence respectivement au FAM et VIC. Le logiciel QuantaSoft (version 1.7.4; BioRad, Hercules, CA USA) a été utilisé pour attribuer les gouttelettes positives/négatives et faire la conversion en nombre de copies/mL pour le transcrit cible et celui de référence. Seuls les échantillons ayant plus de 5000 copies de GUSB ont été pris en considération pour le dosage du CD90. Les niveaux d'expression des CD90 ont été exprimés sous la forme d'un rapport entre le nombre de copies de CD90 et le nombre de copies de GUSB.

7.3 Statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel R, en utilisant notamment des libraires de survie et l'environnement de travail Rstudio [151]. Il a été considéré que la différence était statistiquement significative lorsque la valeur p était <0.05 . Pour les analyses de survie, on a défini un événement par la survenue d'une acutisation, d'une rechute ou d'un décès. Les courbes ROC ont été réalisées avec la library pROC.

Troisième partie

Résultats

Chapitre 8

Cohorte LMMJ

Préambule

Ainsi pour résumer, la Leucémie Myélo-Monocytaire juvénile (LMMJ) est une hémopathie chronique de l'enfant avec une prolifération excessive des cellules de la lignée myélomonocytaire. Il existe une variation importante du pronostic dans cette maladie.

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques étant un traitement très toxique, avec une mortalité non négligeable imputable à la procédure, il est crucial de déterminer les facteurs à même de prédire l'évolution des LMMJs. Certaines LMMJs peuvent être indolentes voire régresser spontanément, et dans ce cas une greffe allogénique constitue une mise en danger inutile de la vie du patient. A l'inverse, dans certaines LMMJs agressives, ne pas recourir à la greffe constitue une perte de chance.

Comme vu précédemment, certains facteurs pronostiques sont connus comme l'anomalie génétique sous-jacente, l'existence de mutations additionnelles et d'anomalies épigénétiques.

D'autres marqueurs comme l'expression de LIN28B pourrait également avoir un rôle pronostique, mais dans la mesure où une seule publication a pour l'instant mis en évidence son intérêt, son importance reste à préciser.

Encore plus récemment, il a été montré une expression aberrante du CD90 dans les cellules souches en Cytométrie en Flux (CMF) qui persistait dans les progéniteurs, en particulier les GMP [134]. Notre hypothèse a été de penser que ce sous-type de LMMJ pouvait se distinguer des autres, et ainsi avoir un pronostic différent des LMMJ sans dérégulation du CD90.

Cependant, seul un faible nombre de patients avaient pu être analysés, d'une part en raison de la rareté de la pathologie et du recueil en prospectif, d'autre part il est difficile d'obtenir des cellules vivantes triées en quantité suffisante dans la pratique de routine du laboratoire. Il était donc nécessaire de chercher un autre moyen d'approfondir cette hypothèse.

Nous nous sommes donc tournés vers l'expression du CD90 en ARN dans les cellules mononucléées totales. Ce choix était possible puisqu'il avait été montré en CMF que l'expression persistait dans les cellules matures. De plus, de manière pragmatique, le stockage des ARNs des cellules mononucléées totales de patients atteints de LMMJ fait parti de l'activité de routine au laboratoire de génétique de l'hôpital Robert Debré. Aussi, il a été possible de récupérer des échantillons afin

d'analyser l'expression du CD90 en ARN pour la plupart des 117 patients, par rapport aux 36 patients passés en CMF dans l'étude de Caye et al. 2019 [134].

Avant d'aller plus loin et de chercher un éventuel intérêt pronostique de ce marqueur, il a fallu mettre au point un test en ddPCR pour évaluer le niveau d'expression du transcrit sur dans cellules mononuclées.

Condordance entre ddPCR et cytométrie en flux

Pour valider ce test d'expression du CD90 en ddPCR, nous avons commencé par comparer l'expression du CD90 dans les cellules mononuclées totales pour les patients chez qui l'étude en CMF du CD90 avait été déjà réalisée. En effet, on pouvait se demander à ce stade si l'expression protéique était bien le résultat d'une dérégulation transcriptionnelle.

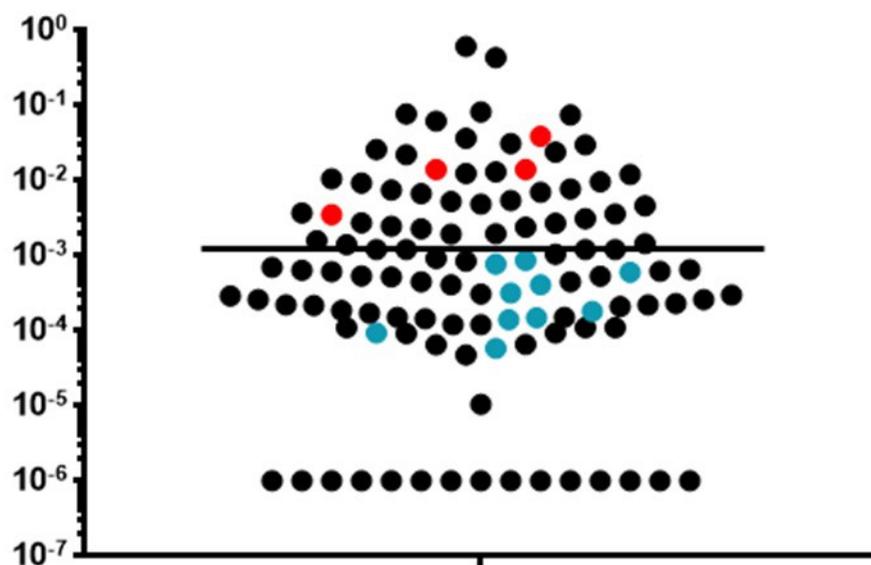


Figure 8.1 – Expression de la transcription du CD90 mesurée par ddPCR dans les cellules mononuclées totales (rapport entre l'expression de CD90 et l'expression de GUSB) dans une série de 117 JMML.

La ligne noire indique le seuil (correspondant aux 40 % supérieurs) choisi pour définir une surexpression CD90⁺ (CD90^{high}) dans les LMMJ. Les échantillons de LMMJ négatifs pour l'expression de la protéine CD90 dans les progéniteurs en cytométrie de flux (n=10; points bleus) étaient tous inférieurs à ce seuil. Au contraire, les échantillons positifs (n=4; points rouges) étaient dans les 40 % des valeurs les plus élevées d'expression de CD90.

Le seuil de surexpression de l'ARNm de CD90 (CD90^{high}) a d'abord été établi en prenant les 40 % des valeurs les élevées de CD90 (soit copies CD90/GUSB = 0.001357) sur l'ensemble de la cohorte (voir figure 8.1).

Expression aberrante dans les progéniteurs	Expression du CD90 dans les MNC	Mutations initiatrices
Surexpression	Surexpression	PTPN11 somatiques
GMP seuls	Normale	NRAS
Normale	Inconnu	KRAS
Inconnu		RRAS-RRAS2 somatiques
		NF1
		Noonan
		CBL
		Autres
		Inconnu

Figure 8.4 – Légende de la figure 8.3

Les cases en gris désignent les patients chez qui on ne dispose pas de l'information, que l'analyse n'a pas pu être faite en raison d'un prélèvement insuffisant ou qu'elle est non applicable. Pour l'HbF, lorsque le taux est inconnu ou ininterprétable en raison d'un âge < 6 mois, les cases sont grisées. Pour la rechute, les cases en gris correspondent aux cas non applicables (les patients n'ont pas pu rechuter car ils n'ont pas été greffés), tandis que les cases blanches signalent les patients greffés qui n'ont pas rechutés.

Mutations additionnelles : Mutations récurrentes avec une VAF (Variant Allele Frequency > 20 %) dans les gènes *ASXL1*, *SETBP1* ou *JAK3* ; comprends également les doubles mutants RAS (hétérozygote composite ou avec perte d'hétérozygotie), et les altérations du PRC2 (atteinte *ASXL1*, *SETBP1* et monosomie 7).

Marqueurs de sévérité : Acutisation/rechute/décès/excès de blastes (> 10 %)/doubles mutants/mutation additionnelle récurrente. CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques. MNC : Cellules mononuclées totales. HbF : Hémoglobine Fœtale.

Expression du CD90 et LIN28B

Préambule

On a cherché des associations entre CD90 et les autres marqueurs pronostiques connus, dont LIN28B. Cependant, dans la mesure où il a été décrit dans une unique publication, nous avons aussi réévaluer l'intérêt de ce marqueur.

Sur les 112 patients LMMJ chez qui on a réalisé l'étude de l'expression du transcrit CD90, on a exclu les patients sans mutation initiatrice (Inconnu dans la figure 8.3 de l'Annexe, n = 6), les patients avec une autre mutation initiatrice (Autres, c'est à dire avec mutation SH2B3, TCIRG1, RRAS /RRAS2 germinale n = 10), et NF1 sporadique (n=1), afin de disposer de groupes homogènes : c'est à dire 96 patients ont été pris en compte.

Pour l'étude de LIN28B et du taux d'HbF, les patients dont le diagnostic a été fait avant 6 mois, ont été exclus. En effet, les variations interindividuelles sont importantes durant la période néonatale.

Expression du CD90 selon la mutation initiatrice

Afin d'évaluer l'intérêt pronostique de CD90, nous avons commencé par regarder son profil de distribution selon les sous-types génétiques.

Dans le groupe majoritaire, des *PTPN11* somatiques, l'expression de CD90 est très hétérogène, en moyenne supérieure à la normale. La dispersion est aussi importante dans le groupe *NRAS* et *NF1*.

On observe aussi que pour les groupes *KRAS* et Noonan, l'expression du CD90 est en moyenne normale, tandis que la dispersion est relativement faible par rapport aux autres groupes. Dans le groupe *RRAS/RRAS2*, la dispersion est également faible. On n'observe toutefois pas de différences significatives d'expression du CD90 en fonction des différents groupes de LMMJ selon la mutation initiatrice (voir figure 8.5, $p = 0.0801$ Kruskal-Wallis rank sum test). Les groupes *KRAS* somatiques et Noonan ont tendance à être sous-exprimés dans notre cohorte, et *RRAS /RRAS2* somatiques surexprimés.

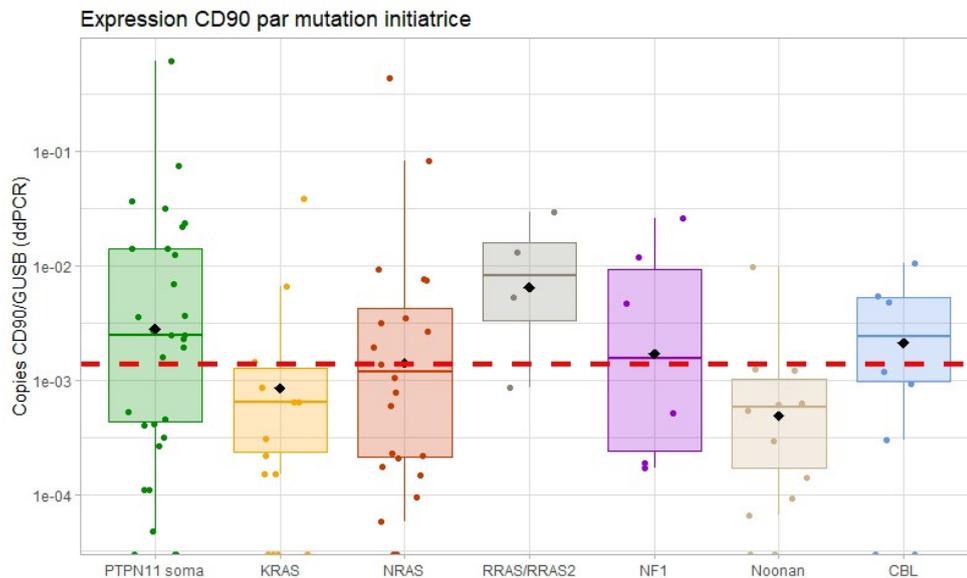


Figure 8.5 – Expression du *CD90* par sous-groupes.

La ligne rouge correspond au seuil de surexpression (Ratio copies CD90/GUBS > 0.001357). *PTPN11* soma : *PTPN11* somatique. *KRAS*, *NRAS*, *RRAS/RRAS2* sont somatiques. *NF1*, *CBL*, Noonan sont germinales.

Expression de LIN28B selon la mutation initiatrice

On a ensuite vérifié l'expression de LIN28B en fonction de la mutation initiatrice.

Contrairement à CD90, il existe en effet une différence d'expression entre les groupes ($p = 0.005968$, Kruskal-Wallis rank sum test). Les tests appariés montrent une différence d'expression entre les groupes *PTPN11* somatiques et *NF1* avec les groupes *CBL*, Noonan et *KRAS* (voir figure 8.7), mais après ajustement de la p-value par la méthode de Holm, seule la différence entre d'expression de *LIN28B* entre *NF1* et *CBL* est statistiquement significative (voir figure 8.7).

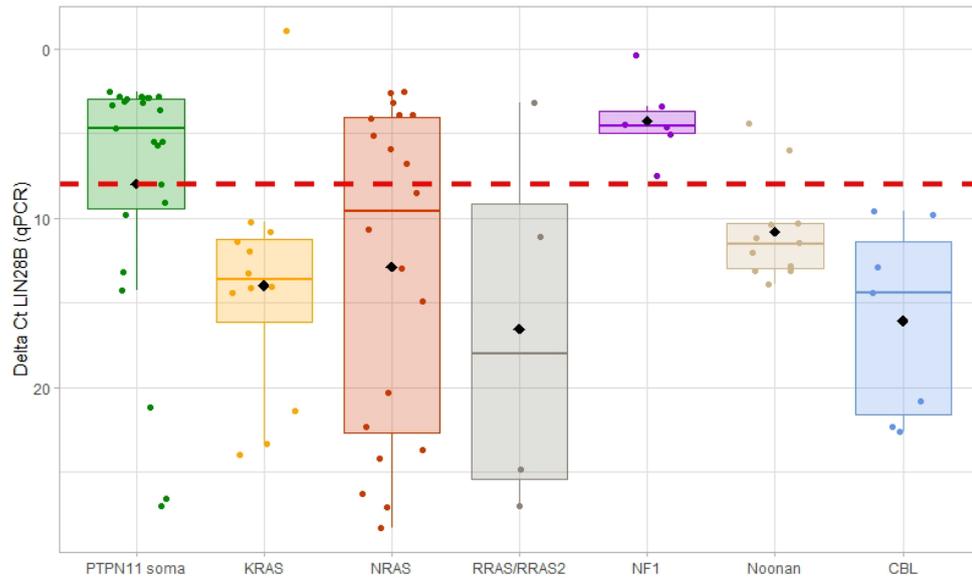


Figure 8.6 – Expression de *LIN28B* par sous-groupes.

La ligne rouge correspond au seuil de surexpression Delta Ct < 8 pour *LIN28B*, l'axe des ordonnées a été inversé pour représenter les patients surexprimés au-dessus de la ligne rouge pour les deux graphiques). *PTPN11* soma : *PTPN11* somatique. *KRAS*, *NRAS*, *RRAS/RRAS2* sont somatiques. *NF1*, *CBL*, Noonan sont germinales.

A						
	PTPN11	KRAS	NRAS	RRAS/RRAS2	NF1	Noonan
KRAS	0,01061	-	-	-	-	-
NRAS	0,05910	0,55180	-	-	-	-
RRAS/RRAS2	0,09424	0,68352	0,52494	-	-	-
NF1	0,60881	0,00323	0,07200	0,17143	-	-
Noonan	0,02242	0,10371	0,88698	0,66081	0,00307	-
CBL	0,00866	0,90180	0,39984	0,78788	0,00117	0,12594

B						
	PTPN11	KRAS	NRAS	RRAS/RRAS2	NF1	Noonan
KRAS	0,18042	-	-	-	-	-
NRAS	0,88655	1,00000	-	-	-	-
RRAS/RRAS2	1,00000	1,00000	1,00000	-	-	-
NF1	1,00000	0,06141	1,00000	1,00000	-	-
Noonan	0,35865	1,00000	1,00000	1,00000	0,06141	-
CBL	0,15594	1,00000	1,00000	1,00000	0,02448	1,00000

Figure 8.7 – Comparaison multiple : niveau d'expression de *LIN28B* en fonction de la mutation initiatrice - test de Kruskal-Wallis.

A : sans correction de la p-value. B : avec correction de la p-value par la méthode de Holm.

Corrélation LIN28B et HbF

Dans la littérature, LIN28B est corrélé au taux d'HbF [107]. De façon compatible avec ces données, on retrouve bien corrélation entre l'expression de LIN28B, et taux d'hémoglobine foetale (les patients diagnostiqués < 6 mois, ont été exclus en raison de la variabilité du tau d'HbF). La concordance entre surexpression de LIN28B et élévation de l'HbF pour l'âge est de 89 %, R de Spearman = 0.79, $p = 9.39e^{-15}$ (voir figure 8.8).



Figure 8.8 – Corrélation LIN28B-HbF.

Chapitre 9

CD90 et facteurs pronostiques

Facteurs de risque traditionnels

Afin de savoir si la surexpression de *CD90* pouvait avoir un intérêt pronostique, nous avons cherché si elle était associée avec les facteurs connus de mauvais pronostic dans les LMMJ (voir figure 9.4).

On s'est intéressé en premier aux facteurs pronostiques traditionnels, à savoir un âge au diagnostic > 2 ans, une thrombopénie au diagnostic < 33 G/L, un taux d'HbF élevé pour l'âge et la présence d'une monosomie 7 dans les cellules tumorales.

Lorsque la surexpression du *CD90* est associée avec un âge au diagnostic > 2 ans. La proportion des patients diagnostiqués après 2 ans est de 63.4 % dans le groupe *CD90*^{high}, contre 30.9 % dans le groupe *CD90*^{low}, soit une proportion de patients diagnostiqués avant 2 ans de 69.1 % dans le groupe *CD90*^{low} contre 36.6 % dans le groupe *CD90*^{high} (test du khi2, $p = 0.00153457$).

La thrombopénie < 33 G/L au diagnostic est également plus fréquente dans le groupe *CD90*^{high} que dans le groupe *CD90*^{low} (Proportion de 31.6 % dans le groupe *CD90*^{high} contre 10.9 % dans le groupe *CD90*^{low}, khi-2, $p = 0.01871$, $n = 84 < 96$ car on ne disposait pas toujours de l'hémogramme au diagnostic chez des patients diagnostiqués en dehors de l'hôpital Robert Debré).

On observait pas de différence significative entre les deux niveaux de *CD90* pour la présence d'une hémoglobine fœtale élevée pour l'âge ni d'une monosomie 7. On note cependant une tendance, l'hémoglobine fœtale au diagnostic est plus élevée dans le groupe *CD90*^{high} (khi2, $p = 0.05331446$, $n = 59 < 96$ en raison des données manquantes).

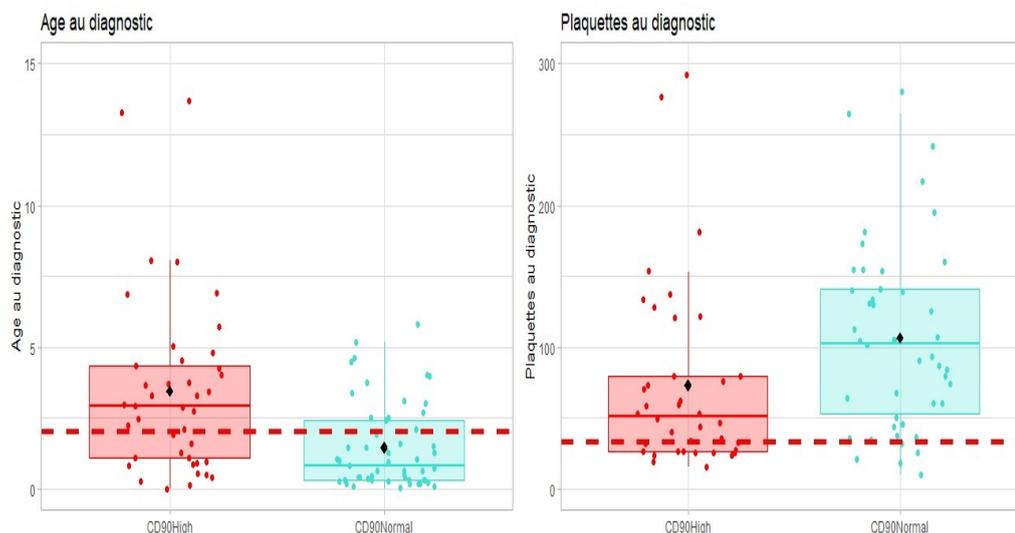


Figure 9.1 – Facteurs de risque traditionnels et expression CD90

Facteurs de risque moléculaires

On a ensuite considéré la surexpression de *LIN28B*, la présence de doubles mutants RAS, de mutations additionnelles récurrentes, et la présence d'au moins un marqueur de mauvais pronostic.

Les patients de moins de 6 mois n'ont pas été pris en compte dans l'analyse de la surexpression *LIN28B*, en raison des variations interindividuelles importantes durant cette période. Il n'a pas été retrouvé de différences significatives entre les deux niveaux d'expression de *CD90*.

Les doubles Mutants *RAS* ont été définis comme la présence d'une seconde mutation dans les gènes de la voie RAS impliqués dans les LMMJs, ou bien d'une perte d'hétérozygotie dans le gène de la mutation initiatrice. La proportion de doubles mutants *RAS* était plus importante dans le groupe *CD90*^{high} que dans le groupe *CD90*^{low} (respectivement 29.3 % contre 5.5 %, $p = 0.00147941$, voir figure 9.4).

On parlera de mutations additionnelles comme un critère composite défini par la présence d'au moins un des critères suivants :

Doubles mutants *RAS*, mutations avec une fréquence allélique ou VAF (Variant Allele Frequency) > 20 % dans un des gènes *ASXL1*, *SETBP1*, *JAK3*, ou une monosomie 7.

La proportion de patients avec mutations additionnelles est plus importante dans le groupe *CD90*^{high} (53.7 %), que dans le groupe *CD90*^{low} (23,6 %, χ^2 , $p = 0.00250202$).

Enfin, on a utilisé un critère composite plus globale pour rassembler les facteurs de risque qui prend en compte les doubles mutants RAS, les mutations additionnelles récurrentes, et les facteurs de risque clinique (Greffe de CSH, rechute, acutisation, excès de blastes au diagnostic, c'est à dire > 10 % de blastes, et décès). On retrouve ainsi un plus forte proportion des patients qui ont au moins l'un de ces facteurs de risque dans le groupe CD90^{high} (68.3 %) par rapport au groupe CD90^{low} (36.4 %, p = 0.0196846).

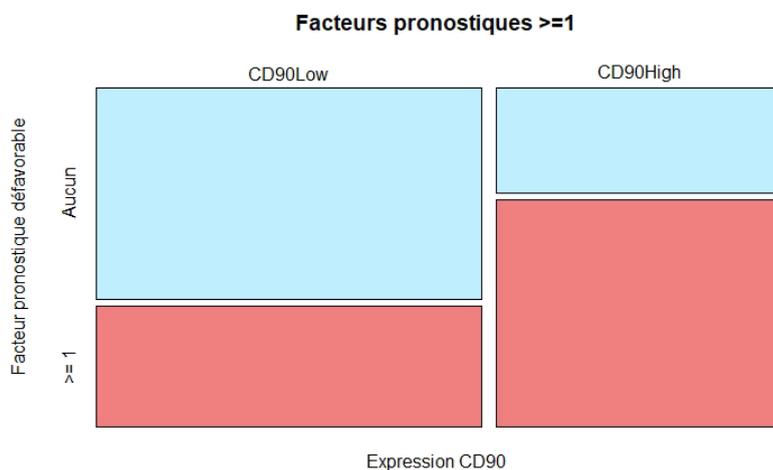


Figure 9.2 – Facteurs de risque et expression CD90

Facteurs de risque cliniques

Enfin on a observé la relation entre niveau d'expression de l'ARNm CD90 et facteurs de gravité cliniques pour l'acutisation (> 20 % de blastes au cours de l'évolution de la LMMJ) et l'excès de blastes au diagnostic (> 10 % de blastes), la rechute post-greffe, et les décès.

L'acutisation et l'excès de blastes sont plus fréquents dans le groupe CD90^{high} (proportion de 36.6 %) que dans le groupe CD90^{low} (7.7 %, $p = 6.01e^{-4}$).

Il n'existait pas de différence significative entre les deux groupes concernant les taux de rechute ni de décès.

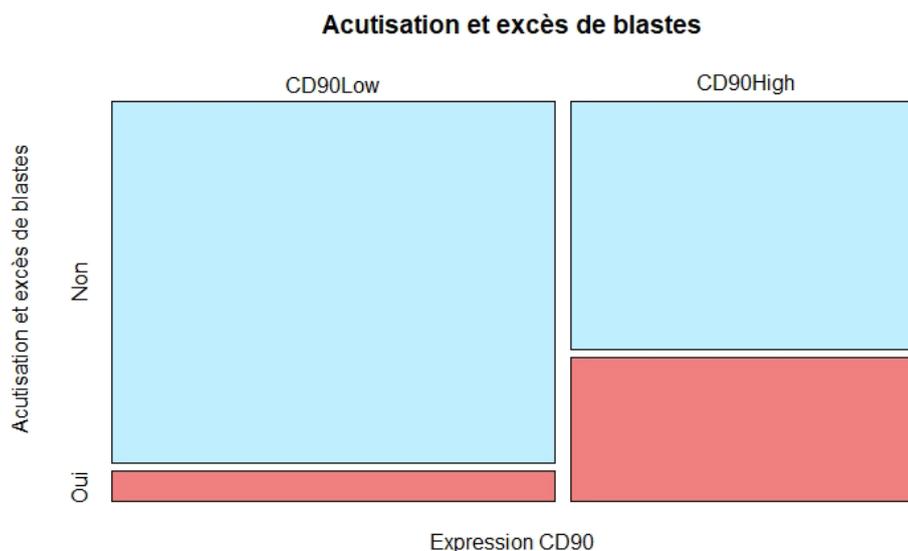


Figure 9.3 – Facteurs de risque cliniques et expression CD90

Facteurs pronostiques traditionnels		Total patients analysés	CD90 low	CD90 high	p value
Age > 2 ans	non	96	55	41	0,00153457
	oui	53 (55,2 %)	38 (69,1 %)	15 (36,6%)	
Plaquettes < 33 G/L	non	84	46	38	0,01871
	oui	67 (79,8 %)	41 (89,1 %)	26 (65,8 %)	
HbF élevé pour l'age	non	59	28	31	0,05331446
	oui	20 (33,9%)	13 (46,4 %)	7 (22,6 %)	
Monosomie 7	non	96	55	41	0,23031165
	oui	80 (83,3 %)	48 (87,3 %)	32 (78,0 %)	
			7 (12,7 %)	9 (22,0 %)	

Facteurs pronostiques moléculaires		Total patients analysés	CD90 low	CD90 high	p value
Surexpression Lin28b	non	69	33	36	0,12060292
	oui	33 (47,8 %)	19 (57,6 %)	14 (38,9 %)	
Double Mutant RAS	non	96	55	41	0,00147941
	oui	81 (84,4 %)	52 (94,5 %)	29 (70,7 %)	
Mutations Additionnelles	non	96	55	41	0,00250202
	oui	61 (63,5 %)	42 (76,4 %)	19 (46,3 %)	
Présence au moins un marqueur pronostique défavo	non	96	55	41	0,00196846
	oui	48 (50,0 %)	35 (63,6 %)	13 (31,7 %)	
			20 (36,4 %)	28 (68,3 %)	

Facteurs de gravité clinique		Total patients analysés	CD90 low	CD90 high	p value
Acutisation et excès de blastes	non	93	52	41	0,00060109
	oui	74 (79,6 %)	48 (92,3 %)	26 (63,4 %)	
Rechute	non	62	28	34	0,44059356
	oui	53 (85,5 %)	25 (89,3 %)	28 (82,4 %)	
Décès	non	96	55	41	0,29261335
	oui	73 (76,0 %)	44 (80,0 %)	29 (70,7 %)	
			11 (20,0 %)	12 (29,3 %)	

Figure 9.4 – Association entre l'expression de l'ARNm de CD90 et facteurs pronostiques des LMMJs. Test du khi-2.

Performances diagnostiques

Nous avons ensuite quantifiée la capacité de CD90 à prédire la présence d'au moins un marqueur de mauvais pronostic¹.

L'expression en ddPCR du CD90 a une aire sous la courbe (Area Under the Curve, AUC) de 0.691, alors que à titre de comparaison l'AUC de LIN28B² est à 0.615 (voir figure 9.5).

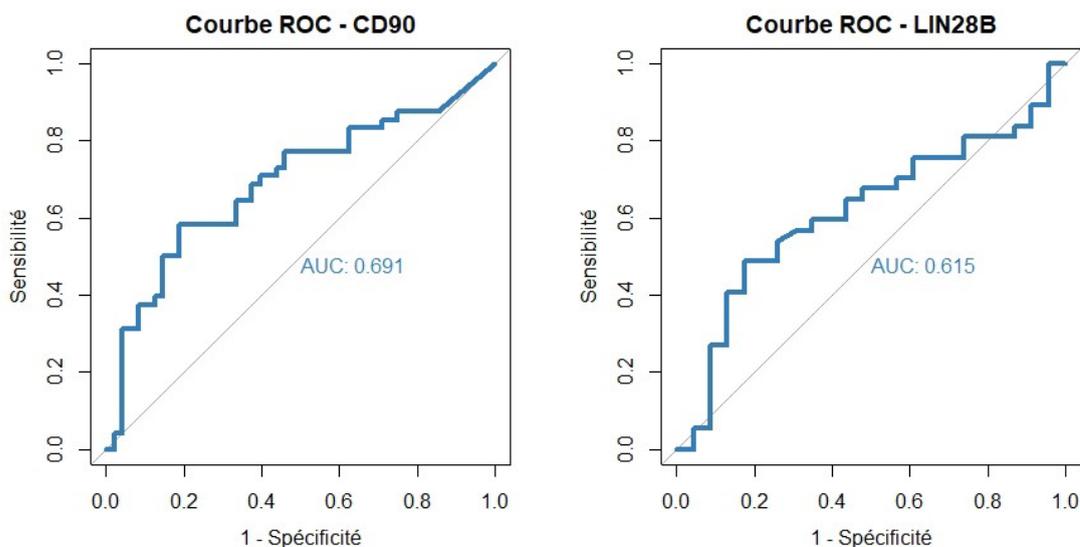


Figure 9.5 – Courbes ROC pour CD90 et LIN28B.

Courbes ROC établies pour évaluer la capacité des ratios CD90/GUSB et delta Ct LIN28B/GUSB à prédire la présence d'un marqueur de mauvais pronostic ou plus¹.

Au seuil initialement choisi, avec un ratio copies CD90/GUSB = 0.001357, la sensibilité de CD90 est de 58.3 % et la spécificité de 72.9 %. Dans notre cohorte, la Valeur Prédictive Positive (VPP) est de 68.3 %, et la valeur Prédictive Négative (VPN) de 63.6 %.

Pour LIN28B, la Sensibilité vaut 62.8 %, la Spécificité 61.5 %, la VPP = 73.0 %, et la VPN = 50.0 %.

En étudiant la courbe ROC de CD90, nous avons pu déterminer qu'une nouvelle limite avec un ratio copies CD90/GUSB = 0.00194251 était plus optimale, parce que la sensibilité reste la même, c'est à dire Se = 58.3 % mais la spécificité est améliorée et passe de Sp = 72.9 % à Sp = 81.3 % avec ce nouveau seuil.

La VPP passe de 68.3 % à 75.7 % et la VPN de 63.6 % à 66.1 %.

Pour LIN28B la valeur choisie était déjà optimale.

1. Doubles mutants RAS, mutations additionnelles récurrentes, facteurs de risque cliniques (greffe de CSH, rechute, acutisation, excès de blastes au diagnostic, c'est à dire > 10 % de blastes, et décès)

2. Les patients de <6 mois ont été exclus

Chapitre 10

Etudes de survie

Préambule

On s'est ensuite intéressé à un effet sur la survie sans événement (on a défini un événement par la survenue d'une acutisation, d'une rechute ou d'un décès), et la survie globale (à partir du diagnostic) à partir de données rétrospectives.

On a réalisé les courbes de Kaplan Meir en prenant en compte les 96 patients, on rappelle qu'on a exclu les patients sans mutation initiatrice (Inconnu dans la figure 8.3 de l'Annexe, n=6), les patients avec une autre mutation initiatrice (Autres, c'est à dire avec mutation *SH2B3*, *TCIRG1*, *RRAS /RRAS2* germinale n = 10), et *NF1* sporadique (n=1), afin de disposer de groupes homogènes. Par ailleurs, on a également exclu les patients Noonan (n=12), car ils représentent une possibilité de biais, en raison d'une mortalité non liée à la LMMJ, mais imputable à leur maladie génétique, notamment les comorbidités cardiaques. Ainsi, les études de survie ont été réalisées chez 84 patients en prenant le seuil de surexpression de *CD90* comme un ratio $CD90 / GUSB = 0.0019425$.

CD90 et survie

La surexpression de CD90 est associée à une réduction de la survie sans événement¹ (voir figure 10.1), et une tendance non significative sur la survie globale (voir figure 10.2).

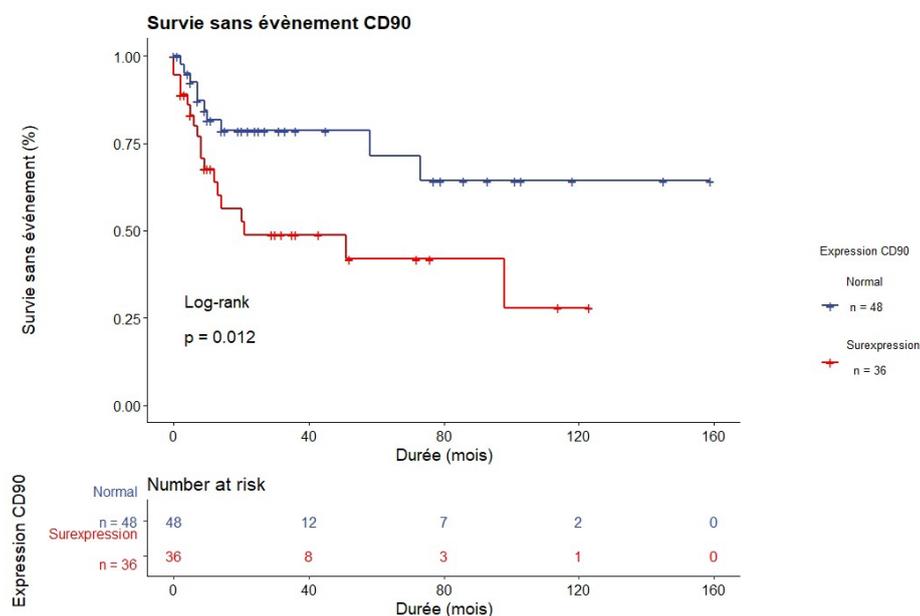


Figure 10.1 – Survie en fonction du *CD90*.
A partir de la cohorte totale à l'exclusion des Noonans/Autres et Inconnus

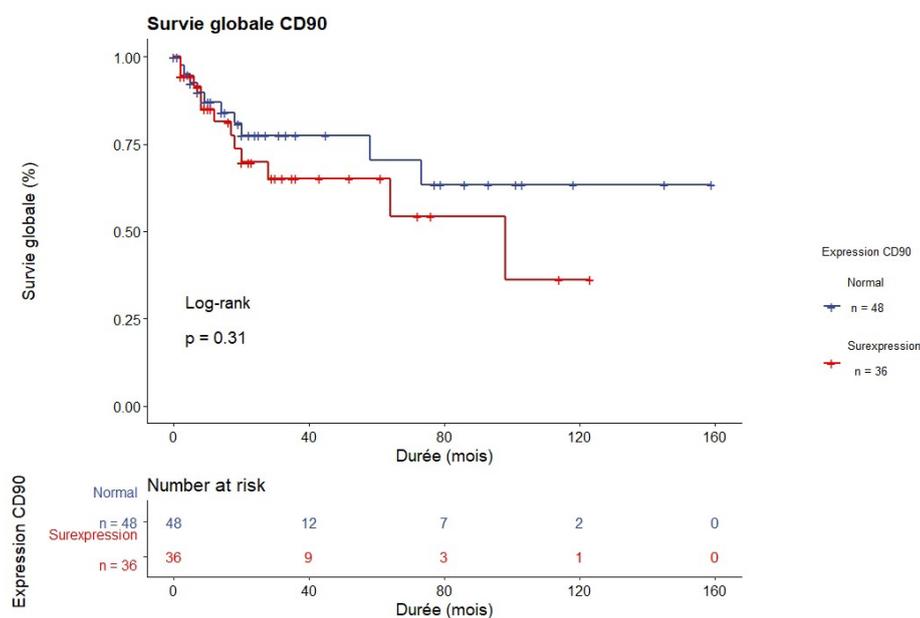


Figure 10.2 – Survie en fonction du *CD90*.
A partir de la cohorte totale à l'exclusion des Noonans/Autres et Inconnus

1. Un événement est défini par la survenue d'une acutisation, d'une rechute ou d'un décès.

En sous groupe, en analysant seulement les patients greffés, on observe pas de différences significatives sur la survie sans évènement (voir figure 10.3), ni la survie globale(voir figure 10.4).

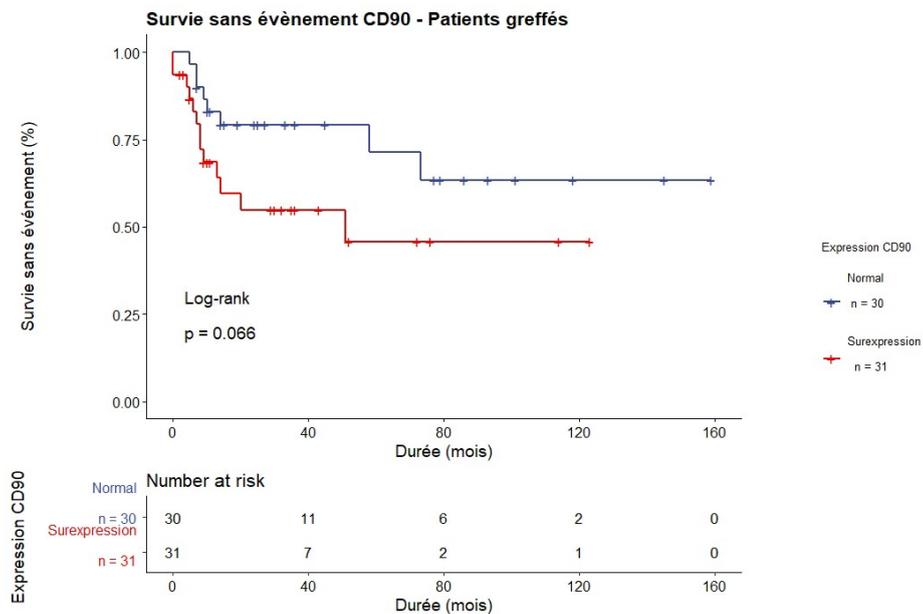


Figure 10.3 – Survie sans évènement en fonction du CD90 chez les patients greffés. A partir des patients greffés de la cohorte totale à l'exclusion des Noonans/Autres et Inconnus.

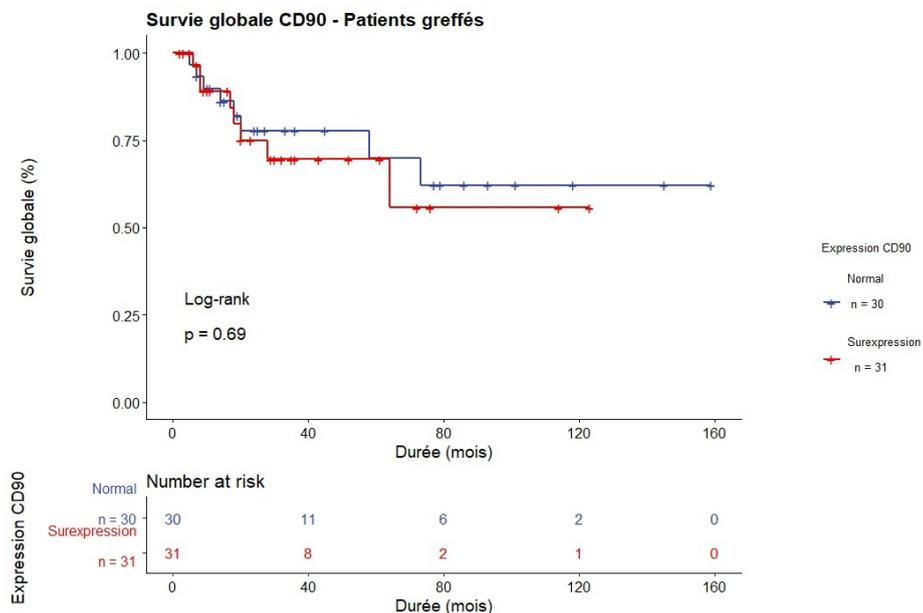


Figure 10.4 – Survie globale en fonction du CD90 chez les patients greffés. A partir des patients greffés de la cohorte totale à l'exclusion des Noonans/Autres et Inconnus.

LIN28B et survie

La surexpression de *LIN28B* est associée à une réduction de la la survie globale (voir figure 10.6), et une tendance non significative sur la survie sans évènement (voir figure 10.5).

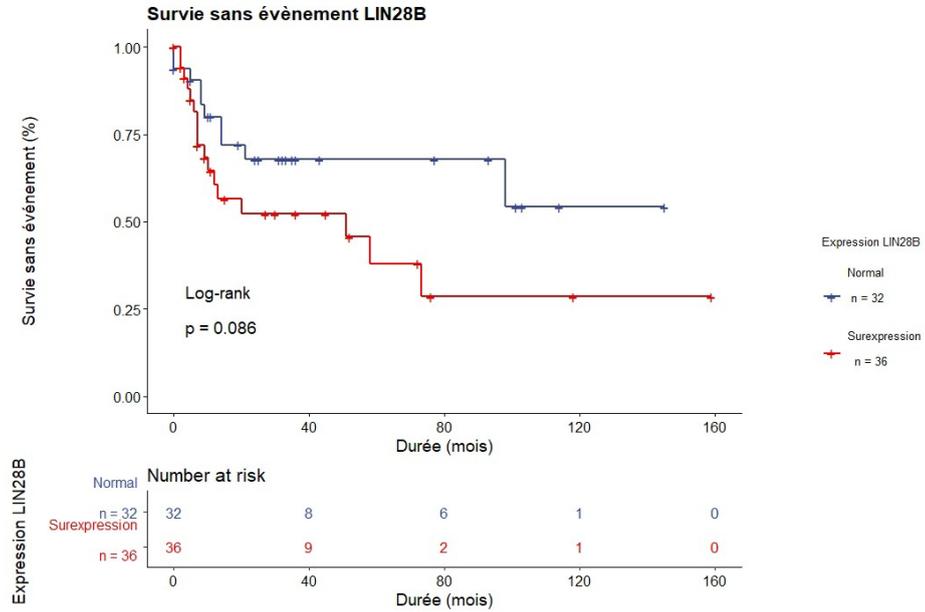


Figure 10.5 – Survie sans évènement en fonction de *LIN28B*.

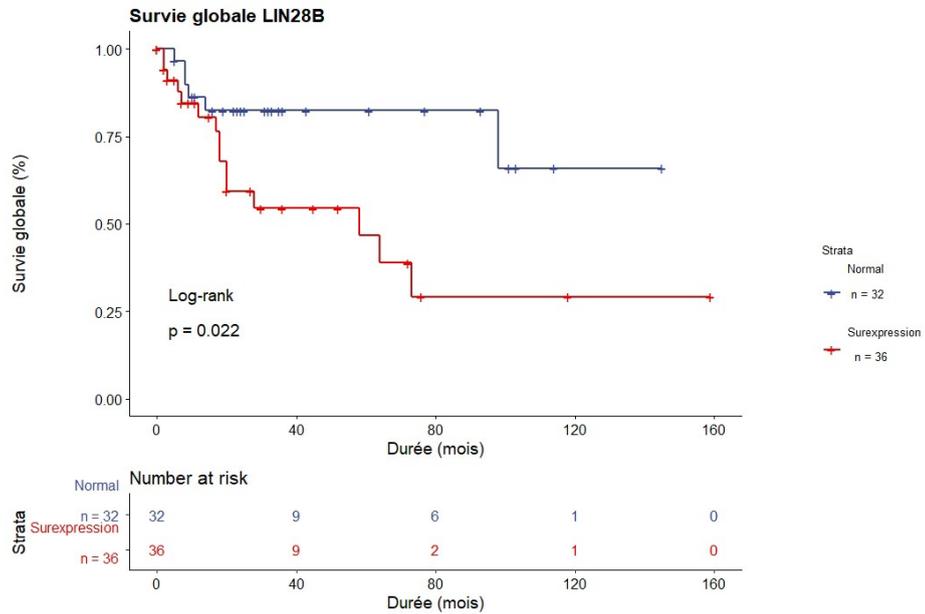


Figure 10.6 – Survie globale en fonction de *LIN28B*.

En sous groupe, en analysant seulement les patients greffés, on observe pas de différences significatives sur la survie sans évènement (voir figure 10.7), ni la survie globale (voir figure 10.8).

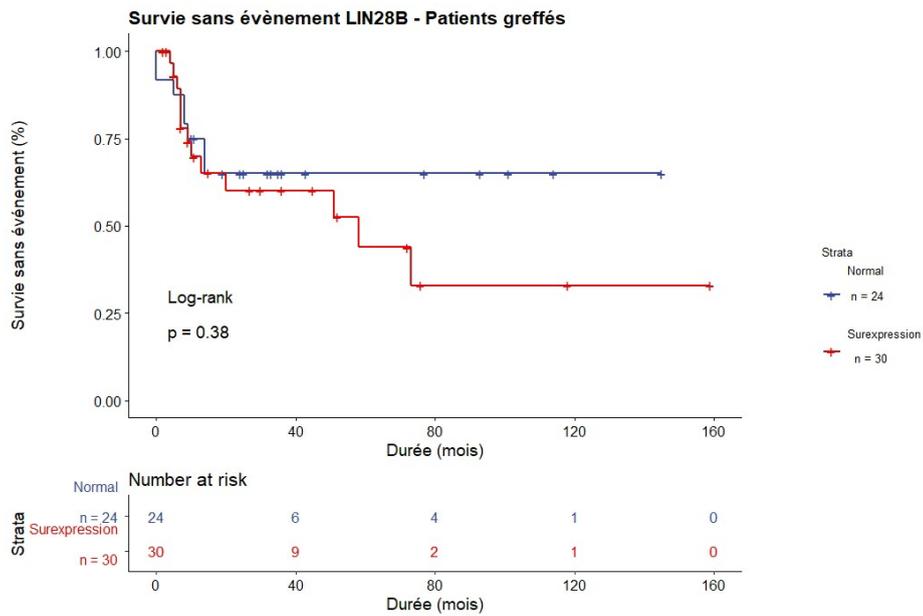


Figure 10.7 – Survie sans évènement en fonction de LIN28B - patients greffés.

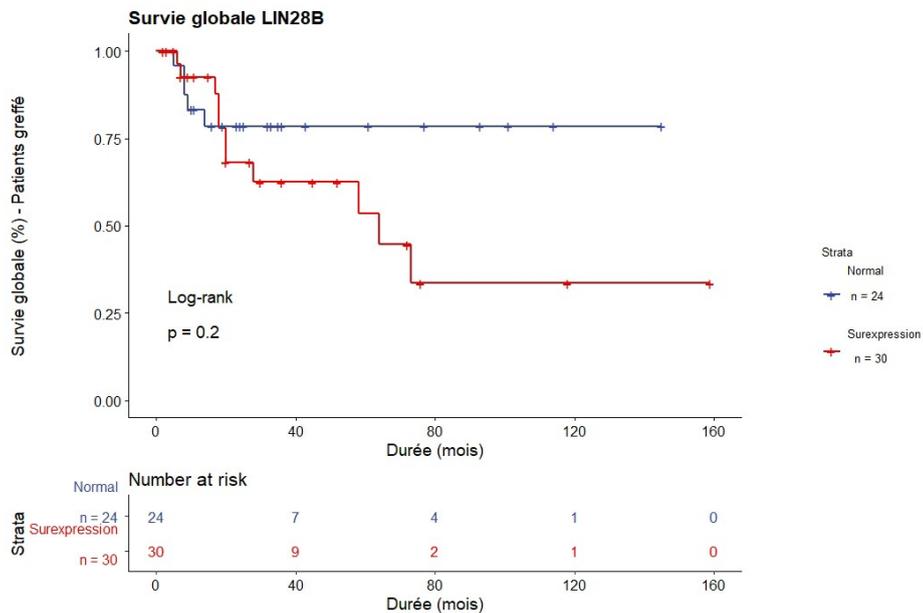


Figure 10.8 – Survie globale en fonction de LIN28B - patients greffés.

Corrélation CD90 et LIN28B

On ne retrouve aucune corrélation directe entre *LIN28B* et *CD90* (voir figure 10.9).

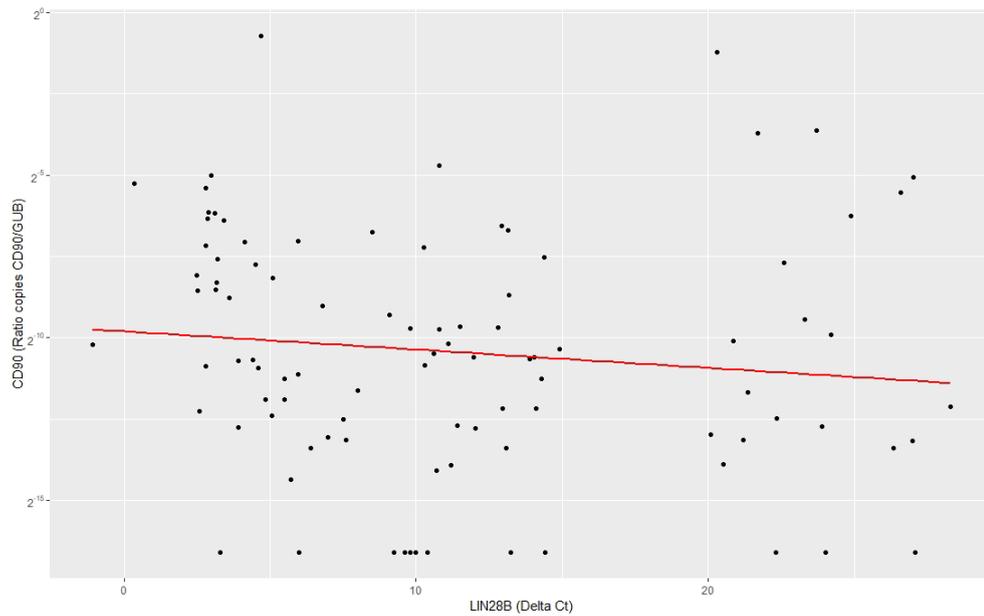


Figure 10.9 – Corrélation entre *LIN28B* et *CD90*.

$R^2 = 0.0156$.

Si l'on s'intéresse aux deux marqueurs à la fois, on observe que les patients doubles positifs (DP) sont associés à une survie sans évènement réduite, par rapport aux patients doubles négatifs (DN). Pour les patients simples positifs ($CD90^+LIN28B^-$ ou $CD90^-LIN28B^+$) on observe une tendance intermédiaire sur la survie sans évènement, non significative (voir figure 10.10).

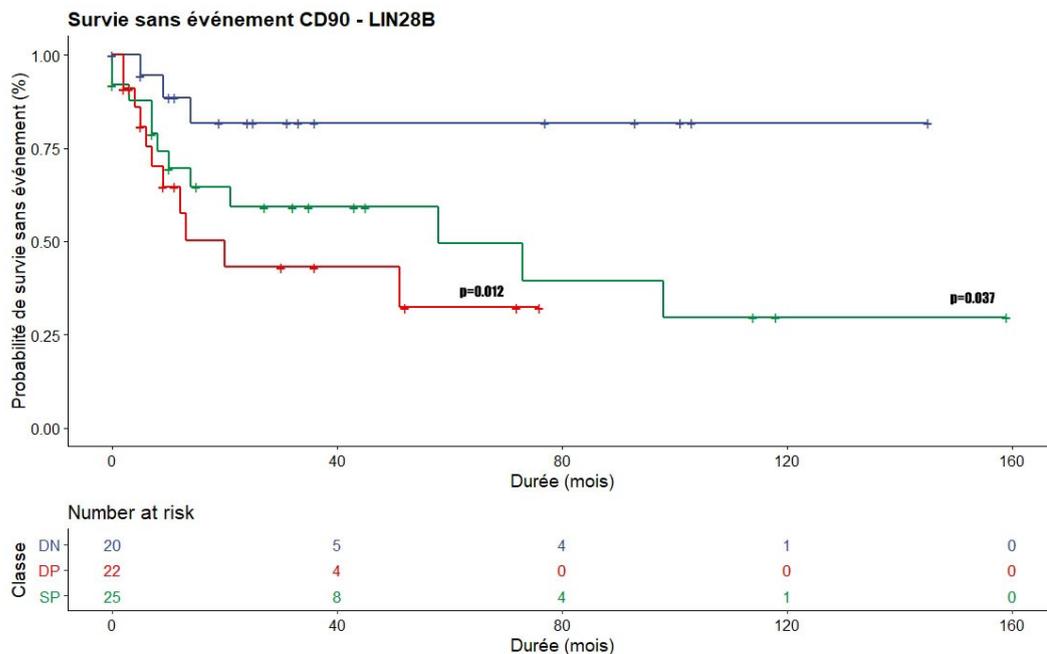


Figure 10.10 – Survie sans événement *LIN28B* et *CD90*.

DN : Doubles Négatifs ($CD90^{-}LIN28B^{-}$); DP : Doubles Positifs ($CD90^{+}LIN28B^{+}$); SP : Simples Positifs ($CD90^{+}LIN28B^{-}$ ou $CD90^{-}LIN28B^{+}$).

p-values issues du test du LogRank avec les Doubles Négatifs (DN).

Sur la survie globale, les doubles positifs (DP) sont associés à une survie réduite, de façon non significative, par rapport aux doubles négatifs (DN). On observe une tendance intermédiaire avec les patients simples positifs (SP) mais non significative (voir figure 10.10).

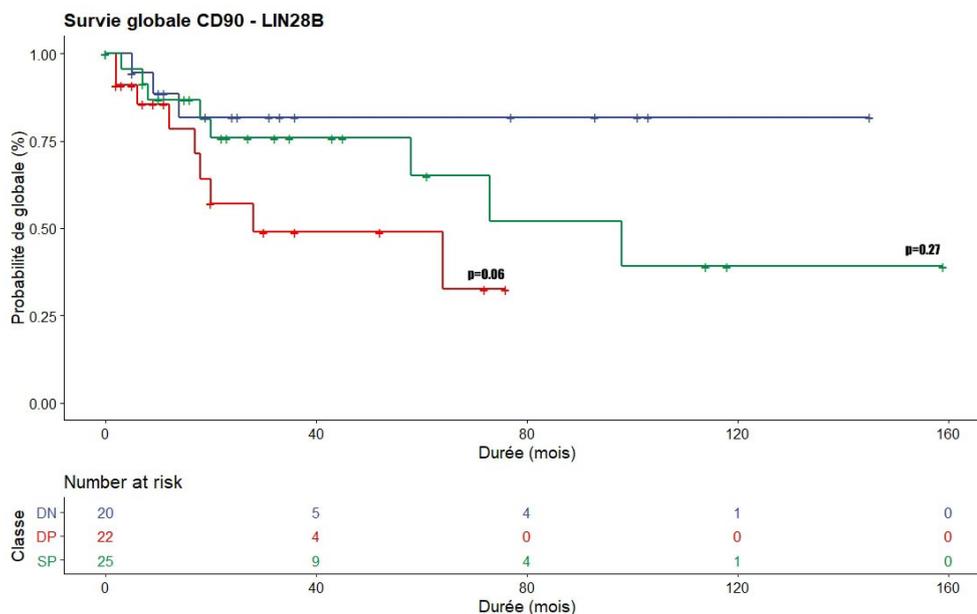


Figure 10.11 – Survie globale *LIN28B* et *CD90*.

DN : Doubles Négatifs ($CD90^{-}LIN28B^{-}$); DP : Doubles Positifs ($CD90^{+}LIN28B^{+}$); SP : Simples Positifs ($CD90^{+}LIN28B^{-}$ ou $CD90^{-}LIN28B^{+}$).

p-values issues du test du LogRank avec les Doubles Négatifs (DN).

En sous groupe, en analysant seulement les patients greffés, on observe pas de différences significatives sur la survie sans évènement (voir figure 10.7), ni la survie globale(voir figure 10.13).

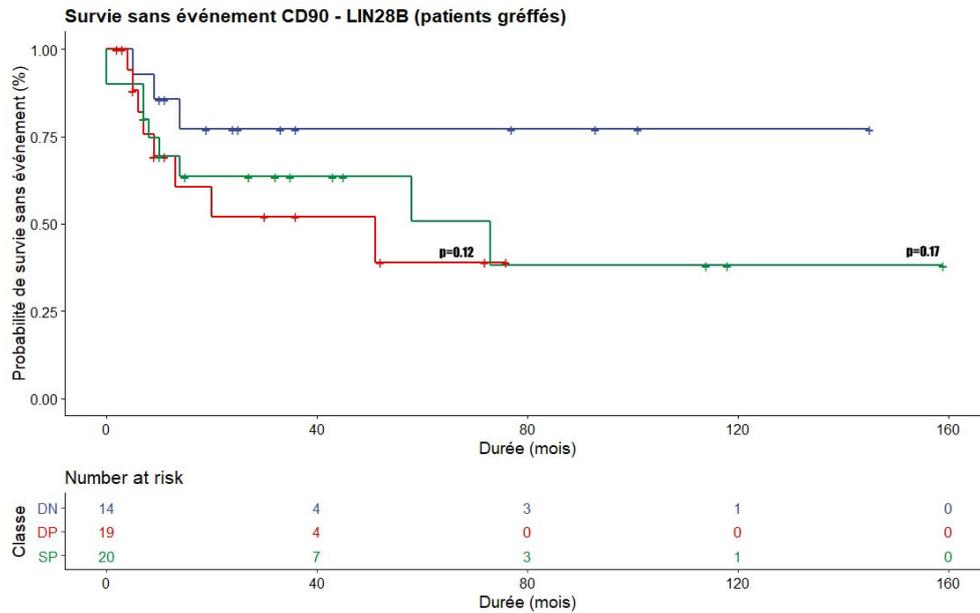


Figure 10.12 – Survie sans évènement LIN28B et CD90 (patients greffés).
 DN : Doubles Négatifs (CD90⁻LIN28B⁻); DP : Doubles Positifs (CD90⁺LIN28B⁺); SP : Simples Positifs (CD90⁺LIN28B⁻ ou CD90⁻LIN28B⁺).
 p-values issues du test du LogRank avec les Doubles Négatifs (DN).

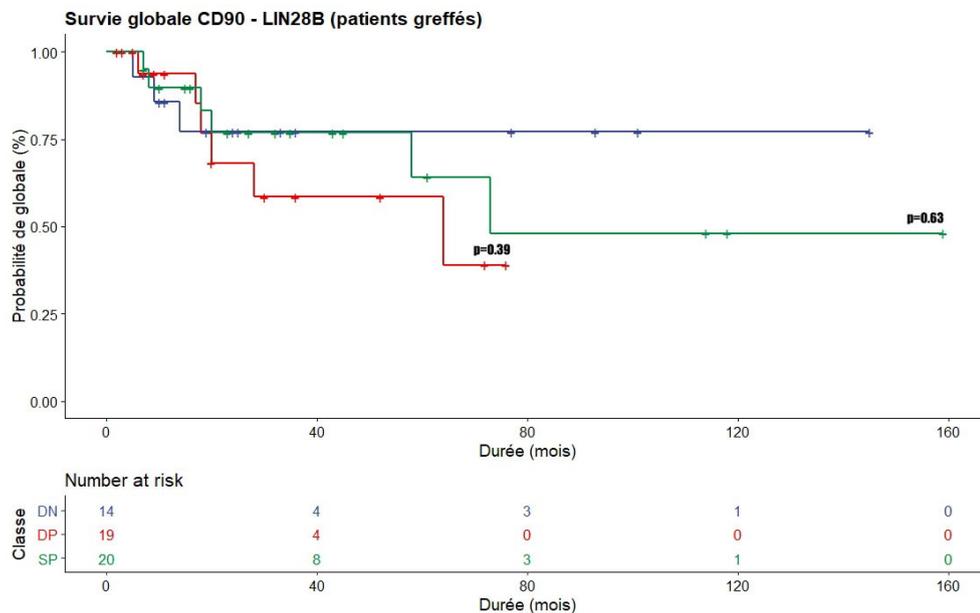


Figure 10.13 – Survie globale LIN28B et CD90 (patients greffés).
 DN : Doubles Négatifs (CD90⁻LIN28B⁻); DP : Double Positifs (CD90⁺LIN28B⁺); SP : Simples Positifs (CD90⁺LIN28B⁻ ou CD90⁻LIN28B⁺).
 p-values issues du test du LogRank avec les Doubles Négatifs (DN).

Quatrième partie

Discussion

Chapitre 11

Cohorte LMMJ

Rappel des objectifs

Le point de départ de ce travail était la constatation d'une surexpression de la protéine CD90 en CMF dans certaines cellules souches hématopoïétiques de patients LMMJ. Une expression aberrante du CD90 persistait dans les progéniteurs jusqu'aux cellules matures [134]. En raison du faible matériel disponible, l'analyse de l'ARNm du CD90 en ddPCR a été privilégiée. L'objectif de cette thèse était d'étudier l'intérêt pronostique potentiel de CD90 dans le cadre de la pratique quotidienne d'un laboratoire centre de référence des LMMJ.

Concordance CMF et ddPCR

Nous avons débuté par l'étude de la corrélation entre expression protéique, à partir des données de CMF faites précédemment au laboratoire, et l'expression en ddPCR de CD90. Nous avons jugé que la concordance entre les deux était relativement satisfaisante, mais il existait cependant quelques discordances.

Dans 3 cas sur 25 (12 %), on a observé une surexpression du transcrit CD90 dans les cellules mononuclées totales alors que l'expression protéique dans les progéniteurs était normale en cytométrie en flux.

L'un de ces patients (#178) avait un ratio copies CD90 sur copies de GUSB à 0,001593, et une expression protéique normale dans les progéniteurs. Si l'on prenait le nouveau seuil de 0.00194251, il y avait alors une concordance entre expression protéique dans les progéniteurs et l'expression de l'ARNm dans les cellules mononuclées totales. Ce nouveau seuil n'améliorait toutefois pas la concordance qui restait de 80 %. Il créait une nouvelle discordance chez un autre patient. Chez celui-ci l'expression protéique était augmentée dans les GMP, alors que l'expression de l'ARNm devenait normale dans les cellules mononuclées totales).

Les deux autres patientes montraient bien une surpression du CD90 (avec un ratio copies *CD90/GUSB* à 0,0105 (#128) et 0,0124 (#40), soit 7.7 fois et 9.1 fois supérieure au seuil). Il existait peut-être une régulation de la traduction en aval qui explique la normalité de l'expression protéique. La première était atteinte d'une LMMJ dans le cadre d'un syndrome CBL, habituellement de mauvais pronostic. Elle est malheureusement décédée 8 ans après le diagnostic. La seconde, atteinte d'une LMMJ PTNP11 sporadique, présentait des marqueurs de mauvais pronostics (monosomie 7, surexpression LIN28B). Elle a rechuté à 7 mois.

Ceci nous suggère, que bien que l'expression protéique soit normale, c'est plu- tôt la surexpression du transcrit qui fait le mauvais pronostic. Cela nous amène à penser que ce n'est pas tant la fonction biologique qu'exerce *CD90*, que son rôle de témoin d'une dérégulation d'expression qui fait l'intérêt de ce marqueur. D'autant que, bien que le coefficient de corrélation entre la CMF et la ddPCR soit médiocre, on retrouvait par la suite une association entre expression du *CD90* en ddPCR et facteurs de mauvais pronostic.

A l'inverse, dans 2 cas sur 25 (8 %), la surpression était présente dans les progéniteurs, et absente dans les cellules mononuclées totales. Cela nous indique, que dans une majorité de cas, l'expression aberrante commence dans la cellule souche, se propage aux progéniteurs, et continue jusque dans la cellule mature. Cependant, il semble ici, que dans une minorité de cas, la surexpression s'interrompait avant le stade de cellule mature. Pour ces discordances, il s'agissait de LMMJs-*PTPN11* sporadiques, avec des facteurs de risque (thrombopénie seule pour l'une, thrombopénie, âge > 2 ans, surexpression *LIN28B* pour l'autre), mais qui n'ont pas rechuté à notre connaissance après des périodes de suivi de 24 et 45 mois.

Expression *CD90* et *LIN28B*

On s'est ensuite interrogé si l'expression du *CD90* était reliée à des sous-groupes particuliers de LMMJ. Nous n'avons cependant pas retrouvé d'association claire en fonction de la mutation initiatrice. L'expression du *CD90* semblait assez hétérogène dans les *PTPN11* somatiques et *NRAS*, et plus homogène, avec une tendance à n'être pas surexprimée, dans les groupes *KRAS* et Noonan.

Pour *LIN28B* dans notre cohorte, ce gène semblait surexprimé dans les LMMJ mutées *PTPN11* sporadiques et les *NF1* par rapport au LMMJ chez les patients atteints de forme syndromique de LMMJ dans les Noonan et les syndromes CBL. Ces deux sous-types étaient effectivement décrits comme ayant un mauvais pronostic dans la littérature [25, 73]. D'autre part, il existait une bonne corrélation entre l'expression de *LIN28B* et le taux d'HbF, un autre marqueur pronostic.

Chapitre 12

CD90 et facteurs de mauvais pronostiques

12.1 Facteurs de risque

Nous nous sommes ensuite intéressé aux liens avec les autres facteurs de risque. Nous avons observé une corrélation entre surexpression du CD90 et un âge au diagnostic > 2 ans, une thrombopénie < 33 G/L, les doubles mutants RAS, les mutations additionnelles, et de manière plus globale avec la présence avec d'au moins un facteur de mauvais pronostic. Ce dernier est un critère composite qui regroupe les mutants RAS, les mutations additionnelles récurrentes, et les facteurs de risque clinique (Greffe de CSH, rechute, acutisation, blastes médullaires > 10 % au diagnostic, et décès).

Cette corrélation suggérait que les LMMJ-CD90+ étaient plus agressives que les LMMJ-CD90-, avec une retentissement sur la lignée megacaryocytaire. Cependant comme il ne s'agissait pas d'une approche single cell, nous n'étions pas en mesure de savoir si la surexpression du CD90 détectée révélait d'une expansion du pool des progéniteurs ou des cellules matures CD90 + en circulation ou dans la moelle. Toutefois, l'association des LMMJ/CD90 + avec un excès de blastes laissait à penser qu'il existe un blocage de la différenciation.

Pour ce qui est du mécanisme biologique qui entraînait la surpression de l'ARNm du CD90, comme nous n'avions pas retrouvé d'association statistique avec la mutation initiatrice, mais qu'au contraire nous observions une association avec les mutations additionnelles et les doubles mutants, on pouvait supposer que la mutation initiatrice n'était pas responsable d'une augmentation de la transcription ou de la stabilisation de l'ARNm de CD90. Ce serait des événements postérieurs à la mutation initiatrice qui causeraient la surexpression du *CD90*.

Chapitre 13

Etudes de survie

CD90

Nous avons finalement mis en évidence ici qu'une surexpression de CD90 était associée à une diminution de la survie sans évènement dans les LMMJ, sans pour autant montrer une différence dans la survie globale. L'analyse en sous-groupe pour les patients greffés n'avait pas montré de différence statistiquement significative.

Comme il s'agissait d'une étude rétrospective, il est possible qu'il existe des biais de perdus de vue, des erreurs de transmissions comme les patients viennent de toute la France et certains de l'étranger. Tous les patients n'ont pas reçu la même prise en charge, et les causes de décès ne sont pas toutes imputables à l'évolution de la LMMJ. En effet, la greffe de cellules souches hématopoïétiques peut se compliquer d'infections, de GvH¹. Les patients atteints de Rasopathies peuvent décéder des comorbidités liées à leur maladie génétique (Par exemple, du fait de la cardiopathie dans le Noonan), c'est pour cette raison que nous avons exclu les patients Noonan, mais d'autres biais peuvent persister. Cependant si ces limitations sont à garder à l'esprit, il faut aussi rappeler qu'il s'agit d'une pathologie très rare, et qu'il serait très long et complexe d'étudier ce marqueur de manière prospectif, et dans le cadre d'une prise en charge standardisée.

Le rôle de CD90 dans la littérature est contradictoire, tantôt un rôle oncogénique dans certains cancers, tandis que dans d'autres il agit comme un suppresseur de tumeur :

Dans le cadre du système hématopoïétique, CD90 est considéré comme un marqueur de cellule souche hématopoïétique et mésenchymateux. Cependant dans une expérience d'induction de cellules pluripotente à partir de fibroblastes embryonnaires murins, il a été identifié que la perte de CD90/THY-1 était un événement précoce du processus de reprogrammation [152]. Sa perte était associée à une surexpression de miR-135b qui cible plusieurs gènes associés à la matrice extracellulaire et il a été suggéré que dans ce contexte il jouerait un rôle de barrière à la pluripotence. Aussi il joue possiblement un rôle contexte dépendant dans le processus de différenciation [153].

CD90 semble favoriser la prolifération, le blocage de CD90 par un anticorps spécifique réduit la capacité d'expansion in vitro des cellules CD34⁺CD90^{up} dans le sang de cordon [154].

1. Réaction du greffon contre l'hôte

Buccisano et al. ont trouvé que l'expression du CD90⁺ dans les leucémie Aigüe myéloïdes (LAM) était associé à une diminution de la survie. L'expression du CD90 était liée aux LAM secondaires et du sujet de plus de 60 ans [155]. Cependant, son rôle comme facteur pronostique est loin d'être admis puisque peu d'études ont confirmé ce résultat. Chavez-Gonzalez et al. ont étudié l'expression du CD90 dans les LAM de l'enfant, et n'ont pas trouvé de différence significative dans le pronostic des patients. Ils ont cependant discuté que leur population était différente [156]. Son rôle pronostique reste encore débattue, d'autant qu'une publication antérieure avait rapporté que c'était la population CD34⁺CD90⁻ qui était capable de maintenir la LAM in vitro et in vivo [157].

Dans les cancers solides, l'expression de CD90 est fréquemment associée aux cellules souches du cancer :

CD90 est surexprimé dans les lignées de Carcinome Hépatocellulaire. On observait une augmentation modérée de la viabilité cellulaire par rapport aux cellules CD90⁻. Les capacités de migration et d'invasion in vitro de ces cellules étaient accrues chez les CD90⁺, ainsi que leur capacité à former des sphères [158].

Dans le glioblastome, l'expression du CD90 était en lien avec celle d'autres marqueurs de cellules souches neuronales, comme le CD133 [159]. De manière similaire, dans plusieurs lignées de cancers du poumon, des propriétés de cellules souches du cancer ont été mise en évidence dans une population CD44^{high} CD90⁺, comme une croissance à long terme in vitro, une surexpression de Nanog et Oct4 par rapport aux CD44^{high} CD90⁻, et une résistance à l'irradiation [160].

CD90 était exprimé dans le mélanome au niveau des cellules endothéliales activées et interagit avec les cellules du mélanome par le biais de l'intégrine α -v- β -3 ce qui favorise le processus de métastase. Dans les souris THY-1^{-/-}, la formation de métastase de mélanome était diminuée, suggérant que l'expression de THY-1 dans les cellules endothéliales induite par les cellules de mélanome favorise la dissémination [161].

Dans les adénocarcinomes de l'ovaire, la perte d'hétérozygotie de la région 11q23.3-q24.3 est associée à un mauvais pronostic et le gène identifié est CD90 [162]. Dans les cellules de lignées SKOV-3, l'ARN messager et la protéine étaient retrouvés dans les cellules non tumorales et absentes des cellules tumorales. CD90 est également sous-exprimé dans le neuroblastome [163], et le cancer du nasopharynx.

LIN28B et CD90

Nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression de *LIN28B* et du *CD90*. Ce qui suggère l'absence de mécanisme de régulation direct entre *LIN28B* et *CD90*. *LIN28B* est connu pour inhiber la maturation des mi-RNA de la famille let-7 [110]. L'analyse in silico par TargetScanHuman [164] suggère qu'il existe deux sites de régulation chez *CD90* en 3'UTR par les miRNAs hsa-miR-107 et hsa-miR-103a-3p, mais ces deux miRNA ne sont pas connus pour être régulés par *LIN28B*.

Dans l'étude de Murakami et al. , *LIN28B* était fréquemment associé au sous-groupe hyperméthylé dans 71 % (32/45) des cas (supplementary data de l'étude de Murakami et al. [106]). Dans notre étude, *LIN28B* est surexprimé dans le groupe

CD90^{high} dans 62 % (23/37) des cas, ce qui est relativement proche, et irait dans le sens d'un lien entre expression aberrante du *CD90* et profil d'hyperméthylation des LMMJ.

En revanche, dans leur étude, la surexpression de *LIN28B* était rare dans le groupe hypométhylé (8 %, 5/61), tandis que l'association d'une expression du *CD90* normal avec une surexpression de *LIN28B* était relativement fréquente dans notre cohorte (41 %, 14/34).

Dans les LMMJ avec mutations initiatrices de *PTPN11*, leucémies de mauvais pronostic, les taux d'hyperméthylation se situaient entre 73 % (35/45, [106]), et 54.2 % (26/48, [104]). Cela est compatible avec la proportion de 60 % de CD90^{high} que l'on retrouvait dans les LMMJ mutées *PTPN11* en sporadique.

Dans les syndromes CBL, les études de Murakami et de Lipka sont concordantes et ne retrouvent aucun profil d'hyperméthylation. Ici, le *CD90* est surexprimé dans 37.5 % des cas (3/8). Il est toutefois à noter que si les LMMJ associées aux syndromes CBL sont souvent indolentes et régressent spontanément, chez ces trois patients 2 ont dû être greffés et le troisième est décédé.

Si l'on utilisait *LIN28B* et *CD90*, on montrait ici que les LMMJ/CD90⁺*LIN28B*⁺ étaient de mauvais pronostic, tandis que les LMMJ/CD90⁻*LIN28B*⁻ étaient associées à une meilleure survie, et ils existaient aussi une catégorie avec une tendance intermédiaire lorsque seulement un seul des deux marqueurs est surexprimé.

Cette distribution en 3 clusters rappelle les sous-classes de LMMJ selon leur profil de méthylation. Les LMMJ/CD90⁺*LIN28B*⁺ pourraient correspondre aux LMMJs hyperméthylées, tandis que les LMMJ/CD90⁻*LIN28B*⁻ seraient des LMMJs au profil hypométhylé. Si tel était le cas, la recherche du *CD90* pourrait constituer une alternative moins onéreuse à un profil de méthylation.

Conclusion

Dans les LMMJs, nous avons pu retrouver une surexpression du transcrite de CD90 dans la masse des cellules mononuclées circulantes en utilisant une technique de quantification absolue par ddPCR. Ceci corrobore les constatations de cytométrie en flux où il avait été montré que la protéine CD90 peut être surexprimée dans les cellules souches hématopoïétiques, et persistait de façon anormale dans les progéniteurs, jusqu'au cellules matures. Nous montrons ici qu'elle peut être aussi présente au niveau transcriptionnel dans les cellules matures. D'autre part, le transcrite CD90 a également un intérêt pronostique puisque sa surexpression est associée avec une réduction de la survie sans progression. Sa mise en place en routine est facile techniquement, et peu de matériel est nécessaire. Étant donné l'enjeu de la greffe dans cette pathologie, il pourra enrichir la discussion et faire parti du panel des facteurs pronostiques guidant la décision de l'hématologue face à une LMMJ. Il est cependant difficile d'affirmer qu'il soit indépendant des autres facteurs de risque. Nous pensons qu'il pourrait se comporter comme un témoin des anomalies de la méthylation décrites dans les LMMJs. Cette hypothèse est cependant à confirmer par une étude de la méthylation afin de chercher une éventuelle corrélation. Si celle-ci était établie, le CD90 pourrait alors être proposé comme un substitut moins onéreux.

Bibliographie

- [1] Daniel A. Arber, Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, and James W. Vardiman. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20) :2391–2405, May 2016. ISSN 0006-4971, 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2016-03-643544.
- [2] Kazuo Sakashita, Kazuyuki Matsuda, and Kenichi Koike. Diagnosis and treatment of juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatrics International : Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 58(8) :681–690, August 2016. ISSN 1442-200X. doi : 10.1111/ped.13068.
- [3] Rebecca J. Chan, Todd Cooper, Christian P. Kratz, Brian Weiss, and Mignon L. Loh. Juvenile myelomonocytic leukemia : a report from the 2nd International JMML Symposium. *Leukemia Research*, 33(3) :355–362, March 2009. ISSN 1873-5835. doi : 10.1016/j.leukres.2008.08.022.
- [4] Joseph Borg, Petros Papadopoulos, Marianthi Georgitsi, Laura Gutiérrez, Godfrey Grech, Pavlos Fanis, Marios Phylactides, Annemieke J. M. H. Verkerk, Peter J. van der Spek, Christian A. Scerri, Wilhelmina Cassar, Ruth Galdies, Wilfred van Ijcken, Zeliha Ozgür, Nynke Gillemans, Jun Hou, Marisa Bugeja, Frank G. Grosveld, Marieke von Lindern, Alex E. Felice, George P. Patrinos, and Sjaak Philipsen. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nature Genetics*, 42(9) :801–805, September 2010. ISSN 1546-1718. doi : 10.1038/ng.630.
- [5] Fabio Candotti. Clinical Manifestations and Pathophysiological Mechanisms of the Wiskott-Aldrich Syndrome. *Journal of Clinical Immunology*, 38(1) :13–27, January 2018. ISSN 0271-9142, 1573-2592. doi : 10.1007/s10875-017-0453-z.
- [6] Matteo Menotti, Chiara Ambrogio, Taek-Chin Cheong, Chiara Pighi, Ines Mota, Seth H. Cassel, Mara Compagno, Qi Wang, Riccardo Dall’Olio, Valerio Minero, Teresa Poggio, Geeta Geeta Sharma, Enrico Patrucco, Cristina Mastini, Ramesh Choudhari, Achille Pich, Alberto Zamo’, Roberto Piva, Silvia Giliani, Luca Mologni, Clayton K. Collings, Cigall Kadoch, Carlo Gambacorti-Passerini, Luigi D. Notarangelo, Ines M. Anton, Claudia Voena, and Roberto Chiarle. Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) is a tumor suppressor in T cell lymphoma. *Nature medicine*, 25(1) :130–140, January 2019. ISSN 1078-8956. doi : 10.1038/s41591-018-0262-9.
- [7] Sharat Chandra, Lucas Bronicki, Chinmayee B. Nagaraj, and Kejian Zhang. WAS-Related Disorders. In Margaret P. Adam, Holly H. Arding, Ro-

berta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora JH Bean, Karen Stephens, and Anne Amemiya, editors, *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 1993.

- [8] Rajesh B. Patil, Chandrakala Shanmukhaiah, Farah Jijina, Shailesh Bamborde, Nilesh Wasekar, Manoj Toshniwal, Aniket Mohite, and Vinod Patil. Wiskott-Aldrich Syndrome Presenting with JMML-Like Blood Picture and Normal Sized Platelets. *Case Reports in Hematology*, 2016 :8230786, 2016. ISSN 2090-6560. doi : 10.1155/2016/8230786.
- [9] Hirozumi Sano, Ryoji Kobayashi, Daisuke Suzuki, Kazue Yasuda, Masanori Nakanishi, Tetsuro Nagashima, Masafumi Yamada, and Kunihiko Kobayashi. Wiskott-Aldrich syndrome with unusual clinical features similar to juvenile myelomonocytic leukemia. *International Journal of Hematology*, 96(2) : 279–283, August 2012. ISSN 1865-3774. doi : 10.1007/s12185-012-1130-x.
- [10] Ayami Yoshimi, Yoshiro Kamachi, Kosuke Imai, Nobuhiro Watanabe, Hisaya Nakadate, Takashi Kanazawa, Shuichi Ozono, Ryoji Kobayashi, Misa Yoshida, Chie Kobayashi, Asahito Hama, Hideki Muramatsu, Yoji Sasahara, Marcus Jakob, Tomohiro Morio, Stephan Ehl, Atsushi Manabe, Charlotte Niemeyer, and Seiji Kojima. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatric Blood & Cancer*, 60(5) :836–841, May 2013. ISSN 1545-5017. doi : 10.1002/pbc.24359.
- [11] Alessandro Coppe, Leonardo Nogara, Matteo Samuele Pizzuto, Alice Cani, Simone Cesaro, Riccardo Masetti, Franco Locatelli, Geertruy Te Kronnie, Giuseppe Basso, Stefania Bortoluzzi, and Silvia Bresolin. Somatic mutations activating Wiskott-Aldrich syndrome protein concomitant with RAS pathway mutations in juvenile myelomonocytic leukemia patients. *Human Mutation*, 39(4) :579–587, 2018. ISSN 1098-1004. doi : 10.1002/humu.23399.
- [12] Chung Yeng Looi, Yoji Sasahara, Yuko Watanabe, Miki Satoh, Ikuko Hakozaiki, Meri Uchiyama, Won Fen Wong, Wei Du, Toru Uchiyama, Satoru Kumaki, Shigeru Tsuchiya, and Shigeo Kure. The open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. *International Immunology*, 26(6) :341–352, June 2014. ISSN 1460-2377. doi : 10.1093/intimm/dxt072.
- [13] Cristina Sobacchi, Anna Villa, Ansgar Schulz, and Uwe Kornak. CLCN7-Related Osteopetrosis. In Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora JH Bean, Karen Stephens, and Anne Amemiya, editors, *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 1993.
- [14] Zornitza Stark and Ravi Savarirayan. Osteopetrosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(1) :5, December 2009. ISSN 1750-1172. doi : 10.1186/1750-1172-4-5.
- [15] Sara Penna, Valentina Capo, Eleonora Palagano, Cristina Sobacchi, and Anna Villa. One Disease, Many Genes : Implications for the Treatment of Osteopetroses. *Frontiers in Endocrinology*, 10 :85, February 2019. ISSN 1664-2392. doi : 10.3389/fendo.2019.00085.

- [16] Claire Hoyoux, Marie Françoise Dresse, Patricia Forget, Caroline Piette, Léon Rausin, Anna Villa, Andre Gothot, and Benoit Florquin. Osteopetrosis mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatrics International : Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 56(5) :779–782, October 2014. ISSN 1442-200X. doi : 10.1111/ped.12342.
- [17] Kejian Zhang, Alexandra H. Filipovich, Judith Johnson, Rebecca A. Marsh, and Joyce Villanueva. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, Familial. In Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora JH Bean, Karen Stephens, and Anne Amemiya, editors, *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 1993.
- [18] Barbara Degar. Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 29(5) :903–913, October 2015. ISSN 08898588. doi : 10.1016/j.hoc.2015.06.008.
- [19] J. I. Henter, G. Elinder, and A. Ost. Diagnostic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. The FHL Study Group of the Histiocyte Society. *Seminars in Oncology*, 18(1) :29–33, February 1991. ISSN 0093-7754.
- [20] Jan-Inge Henter, Annacarin Horne, Maurizio Aricó, R. Maarten Egeler, Alexandra H. Filipovich, Shinsaku Imashuku, Stephan Ladisch, Ken McClain, David Webb, Jacek Winiarski, and Gritta Janka. HLH-2004 : Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatric Blood & Cancer*, 48(2) :124–131, February 2007. ISSN 1545-5009. doi : 10.1002/pbc.21039.
- [21] J.-I. Henter. Treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis with HLH-94 immunochemotherapy and bone marrow transplantation. *Blood*, 100(7) : 2367–2373, September 2002. ISSN 00064971, 15280020. doi : 10.1182/blood-2002-01-0172.
- [22] Deepa Ranjani Jayakody Arachchillage, Trevor F. Carr, Bronwyn Kerr, Kay Hawkins, Anna Kelsey, Mary Judge, and Robert F. Wynn. Juvenile myelomonocytic leukemia presenting with features of neonatal hemophagocytic lymphohistiocytosis and cutaneous juvenile xanthogranulomata and successfully treated with allogeneic hemopoietic stem cell transplant. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 32(2) :152–155, March 2010. ISSN 1536-3678. doi:10.1097/MPH.0b013e3181cf4575.
- [23] Helen T. Shin, Michael B. Harris, and Seth J. Orlow. Juvenile myelomonocytic leukemia presenting with features of hemophagocytic lymphohistiocytosis in association with neurofibromatosis and juvenile xanthogranulomas. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 26(9) :591–595, September 2004. ISSN 1077-4114. doi : 10.1097/01.mph.0000135282.39550.99.
- [24] Annemieke Gerritsen, King Lam, E. Marion Schneider, and Marry M. van den Heuvel-Eibrink. An exclusive case of juvenile myelomonocytic leukemia in association with Kikuchi’s disease and hemophagocytic lymphohistiocytosis and a review of the literature. *Leukemia Research*, 30(10) :1299–1303, October 2006. ISSN 0145-2126. doi : 10.1016/j.leukres.2005.12.027.
- [25] C. M. Niemeyer, M. Aricó, G. Basso, A. Biondi, A. Cantú Rajnoldi, U. Creutzig, O. Haas, J. Harbott, H. Hasle, G. Kerndrup, F. Locatelli, G. Mann,

- B. Stollmann-Gibbels, E. Th van't Veer-Korthof, E. van Wering, M. Zimmermann, and Members of the European Working Group on Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS). Chronic Myelomonocytic Leukemia in Childhood : A Retrospective Analysis of 110 Cases. *Blood*, 89(10) : 3534–3543, May 1997. ISSN 0006-4971, 1528-0020.
- [26] M. Strullu, A. Caye, A. Verloes, and H. Cavé. RASopathies et cancers de l'enfant. *Revue d'Oncologie Hématologie Pédiatrique*, 3(4) :188–196, December 2015. ISSN 22134670. doi : 10.1016/j.oncohp.2015.07.004.
- [27] Hetty H. Helmoortel, Silvia Bresolin, Tim Lammens, Hélène Cavé, Peter Noellke, Aurélie Caye, Farzaneh Ghazavi, Andrica de Vries, Henrik Hasle, Veerle Labarque, Riccardo Masetti, Jan Stary, Marry M. van den Heuvel-Eibrink, Jan Philippé, Nadine Van Roy, Yves Benoit, Frank Speleman, Charlotte Niemeyer, Christian Flotho, Giuseppe Basso, Geertruy Te Kronnie, Pieter Van Vlierberghe, and Barbara De Moerloose. LIN28b overexpression defines a novel fetal-like subgroup of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, 127(9) :1163–1172, March 2016. ISSN 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2015-09-667808.
- [28] L. Busque, D. G. Gilliland, J. T. Prchal, C. A. Sieff, H. J. Weinstein, J. M. Sokol, M. Belickova, A. S. Wayne, K. S. Zuckerman, and L. Sokol. Clonality in juvenile chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 85(1) :21–30, January 1995. ISSN 0006-4971.
- [29] E. Flex, M. Jaiswal, F. Pantaleoni, S. Martinelli, M. Strullu, E. K. Fansa, A. Caye, A. De Luca, F. Lepri, R. Dvorsky, L. Pannone, S. Paolacci, S.-C. Zhang, V. Fodale, G. Bocchinfuso, C. Rossi, E. M. M. Burkitt-Wright, A. Farrotti, E. Stellacci, S. Cecchetti, R. Ferese, L. Bottero, S. Castro, O. Fenneteau, B. Brethon, M. Sanchez, A. E. Roberts, H. G. Yntema, I. Van Der Burgt, P. Cianci, M.-L. Bondeson, M. Cristina Digilio, G. Zampino, B. Kerr, Y. Aoki, M. L. Loh, A. Palleschi, E. Di Schiavi, A. Care, A. Selicorni, B. Dallapiccola, I. C. Cirstea, L. Stella, M. Zenker, B. D. Gelb, H. Cave, M. R. Ahmadian, and M. Tartaglia. Activating mutations in RRAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis. *Human Molecular Genetics*, 23(16) :4315–4327, August 2014. ISSN 0964-6906, 1460-2083. doi : 10.1093/hmg/ddu148.
- [30] Hélène Cavé, Aurélie Caye, Nehla Ghedira, Yline Capri, Nathalie Pouvreau, Natacha Fillot, Aurélien Trimouille, Cédric Vignal, Odile Fenneteau, Yves Alembik, Jean-Luc Alessandri, Patricia Blanchet, Odile Boute, Patrice Bouvagnet, Albert David, Anne Dieux Coeslier, Bérénice Doray, Olivier Dulac, Valérie Drouin-Garraud, Marion Gérard, Delphine Héron, Bertrand Isidor, Didier Lacombe, Stanislas Lyonnet, Laurence Perrin, Marlène Rio, Joëlle Roume, Sylvie Sauvion, Annick Toutain, Catherine Vincent-Delorme, Marjorie Willems, Clarisse Baumann, and Alain Verloes. Mutations in RIT1 cause Noonan syndrome with possible juvenile myelomonocytic leukemia but are not involved in acute lymphoblastic leukemia. *European journal of human genetics : EJHG*, 24(8) :1124–1131, 2016. ISSN 1476-5438. doi : 10.1038/ejhg.2015.273.
- [31] Antoine E. Karnoub and Robert A. Weinberg. Ras oncogenes : split personalities. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(7) :517–531, July 2008. ISSN 1471-0072. doi : 10.1038/nrm2438.

- [32] E. Castellano and J. Downward. RAS Interaction with PI3k : More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & Cancer*, 2(3) :261–274, March 2011. ISSN 1947-6019, 1947-6027. doi : 10.1177/1947601911408079.
- [33] Guido Hansen, Timothy R. Hercus, Barbara J. McClure, Frank C. Stomski, Mara Dottore, Jason Powell, Hayley Ramshaw, Joanna M. Woodcock, Yibin Xu, Mark Guthridge, William J. McKinstry, Angel F. Lopez, and Michael W. Parker. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell*, 134(3) :496–507, August 2008. ISSN 1097-4172. doi : 10.1016/j.cell.2008.05.053.
- [34] Burkhard Becher, Sonia Tugues, and Melanie Greter. GM-CSF : From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*, 45 (5) :963–973, 2016. ISSN 1097-4180. doi : 10.1016/j.immuni.2016.10.026.
- [35] D. DeFeo, M. A. Gonda, H. A. Young, E. H. Chang, D. R. Lowy, E. M. Scolnick, and R. W. Ellis. Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(6) : 3328–3332, June 1981. ISSN 0027-8424.
- [36] R. W. Ellis, D. DeFeo, M. E. Furth, and E. M. Scolnick. Mouse cells contain two distinct ras gene mRNA species that can be translated into a p21 onc protein. *Molecular and Cellular Biology*, 2(11) :1339–1345, November 1982. ISSN 0270-7306.
- [37] E. H. Chang, M. A. Gonda, R. W. Ellis, E. M. Scolnick, and D. R. Lowy. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(16) :4848–4852, August 1982. ISSN 0027-8424.
- [38] K. Shimizu, M. Goldfarb, Y. Suard, M. Perucho, Y. Li, T. Kamata, J. Fera-misco, E. Stavnezer, J. Fogh, and M. H. Wigler. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8) :2112–2116, April 1983. ISSN 0027-8424.
- [39] Robert A. Weinberg. *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, second edition edition, 2014. ISBN 978-0-8153-4219-9 978-0-8153-4220-5.
- [40] Marco Tartaglia, Kamini Kalidas, Adam Shaw, Xiaoling Song, Dan L. Musat, Ineke van der Burgt, Han G. Brunner, Débora R. Bertola, Andrew Crosby, Andra Ion, Raju S. Kucherlapati, Steve Jeffery, Michael A. Patton, and Bruce D. Gelb. PTPN11 Mutations in Noonan Syndrome : Molecular Spectrum, Genotype-Phenotype Correlation, and Phenotypic Heterogeneity. *The American Journal of Human Genetics*, 70(6) :1555–1563, June 2002. ISSN 00029297. doi : 10.1086/340847.
- [41] Marco Tartaglia, Simone Martinelli, Lorenzo Stella, Gianfranco Bocchinfuso, Elisabetta Flex, Viviana Cordeddu, Giuseppe Zampino, Ineke van der Burgt, Antonio Palleschi, Tamara C. Petrucci, Mariella Sorcini, Claudia Schoch, Robin Foa, Peter D. Emanuel, and Bruce D. Gelb. Diversity and functional

consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *American Journal of Human Genetics*, 78(2) :279–290, February 2006. ISSN 0002-9297. doi : 10.1086/499925.

- [42] Luca Pannone, Gianfranco Bocchinfuso, Elisabetta Flex, Cesare Rossi, Giuseppina Baldassarre, Christina Lissewski, Francesca Pantaleoni, Federica Consoli, Francesca Lepri, Monia Magliozzi, Massimiliano Anselmi, Silvia Delle Vigne, Giovanni Sorge, Kadri Karaer, Goran Cuturilo, Alessandro Sartorio, Sigrid Tinschert, Maria Accadia, Maria C. Digilio, Giuseppe Zampino, Alessandro De Luca, Hélène Cavé, Martin Zenker, Bruce D. Gelb, Bruno Dallapiccola, Lorenzo Stella, Giovanni B. Ferrero, Simone Martinelli, and Marco Tartaglia. Structural, Functional, and Clinical Characterization of a Novel PTPN11 Mutation Cluster Underlying Noonan Syndrome. *Human Mutation*, 38(4) :451–459, 2017. ISSN 1098-1004. doi : 10.1002/humu.23175.
- [43] Viviana Cordeddu, Jiani C. Yin, Cecilia Gunnarsson, Carl Virtanen, Séverine Drunat, Francesca Lepri, Alessandro De Luca, Cesare Rossi, Andrea Ciolfi, Trevor J. Pugh, Alessandro Bruselles, James R. Priest, Len A. Pennacchio, Zhibin Lu, Arnavaz Danesh, Rene Quevedo, Alaa Hamid, Simone Martinelli, Francesca Pantaleoni, Maria Gnazzo, Paola Daniele, Christina Lissewski, Gianfranco Bocchinfuso, Lorenzo Stella, Sylvie Odent, Nicole Philip, Laurence Faivre, Marketa Vlckova, Eva Seemanova, Cristina Digilio, Martin Zenker, Giuseppe Zampino, Alain Verloes, Bruno Dallapiccola, Amy E. Roberts, Hélène Cav e, Bruce D. Gelb, Benjamin G. Neel, and Marco Tartaglia. Activating Mutations Affecting the Dbl Homology Domain of SOS2 Cause Noonan Syndrome. *Human Mutation*, 36(11) :1080–1087, November 2015. ISSN 1098-1004. doi : 10.1002/humu.22834.
- [44] Pablo Rodriguez-Viciano, Juan Osos-Prieto, Alma Burlingame, Mike Fried, and Frank McCormick. A Phosphatase Holoenzyme Comprised of Shoc2/Sur8 and the Catalytic Subunit of PP1 Functions as an M-Ras Effector to Modulate Raf Activity. *Molecular Cell*, 22(2) :217–230, April 2006. ISSN 10972765. doi : 10.1016/j.molcel.2006.03.027.
- [45] Marialetizia Motta, Giovanni Chillemi, Valentina Fodale, Serena Cecchetti, Simona Coppola, Silvia Stipo, Viviana Cordeddu, Pompeo Macioce, Bruce D. Gelb, and Marco Tartaglia. SHOC2 subcellular shuttling requires the KEKE motif-rich region and N-terminal leucine-rich repeat domain and impacts on ERK signalling. *Human Molecular Genetics*, 25(17) :3824–3835, September 2016. ISSN 0964-6906, 1460-2083. doi : 10.1093/hmg/ddw229.
- [46] Simone Martinelli, Alessandro De Luca, Emilia Stellacci, Cesare Rossi, Saula Checquolo, Francesca Lepri, Viviana Caputo, Marianna Silvano, Francesco Buscherini, Federica Consoli, Grazia Ferrara, Maria C. Digilio, Maria L. Cavaliere, Johanna M. van Hagen, Giuseppe Zampino, Ineke van der Burgt, Giovanni B. Ferrero, Laura Mazzanti, Isabella Screpanti, Helger G. Yntema, Willy M. Nillesen, Ravi Savarirayan, Martin Zenker, Bruno Dallapiccola, Bruce D. Gelb, and Marco Tartaglia. Heterozygous Germline Mutations in the CBL Tumor-Suppressor Gene Cause a Noonan Syndrome-like Phenotype. *The American Journal of Human Genetics*, 87(2) :250–257, August 2010. ISSN 00029297. doi : 10.1016/j.ajhg.2010.06.015.

- [47] William E. Tidyman and Katherine A. Rauen. Pathogenetics of the RA-Sopathies. *Human Molecular Genetics*, 25(R2) :R123–R132, October 2016. ISSN 1460-2083, 0964-6906. doi : 10.1093/hmg/ddw191.
- [48] Guilherme Lopes Yamamoto, Meire Aguenta, Monika Gos, Christina Hung, Jacek Pilch, Somayyeh Fahiminiya, Anna Abramowicz, Ingrid Cristian, Michelle Buscarilli, Michel Satya Naslavsky, Alexsandra C Malaquias, Mayana Zatz, Olaf Bodamer, Jacek Majewski, Alexander A L Jorge, Alexandre C Pereira, Chong Ae Kim, Maria Rita Passos-Bueno, and Débora Romeo Bertola. Rare variants in *SOS2* and *LZTR1* are associated with Noonan syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 52(6) :413–421, June 2015. ISSN 0022-2593, 1468-6244. doi : 10.1136/jmedgenet-2015-103018.
- [49] Adeline Jacquinet, Adeline Bonnard, Yline Capri, Didier Martin, Bernard Sadzot, Elettra Bianchi, Laurent Servais, Jean-Paul Sacré, Hélène Cavé, and Alain Verloes. Oligo-astrocytoma in *LZTR1*-related Noonan syndrome. *European Journal of Medical Genetics*, page S1769721218306293, January 2019. ISSN 17697212. doi : 10.1016/j.ejmg.2019.01.007.
- [50] Christian P. Kratz, Suthee Rapisuwon, Helen Reed, Henrik Hasle, and Philip S. Rosenberg. Cancer in Noonan, Costello, cardiofaciocutaneous and LEOPARD syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part C : Seminars in Medical Genetics*, 157(2) :83–89, May 2011. ISSN 15524868. doi : 10.1002/ajmg.c.30300.
- [51] Charlotte M Niemeyer, Michelle W Kang, Danielle H Shin, Ingrid Furlan, Miriam Erlacher, Nancy J Bunin, Severa Bunda, Jerry Z Finklestein, Kathleen M Sakamoto, Thomas A Gorr, Parinda Mehta, Irene Schmid, Gabriele Kropshofer, Selim Corbacioglu, Peter J Lang, Christoph Klein, Paul-Gerhard Schlegel, Andrea Heinzmann, Michaela Schneider, Jan Starý, Marry M van den Heuvel-Eibrink, Henrik Hasle, Franco Locatelli, Debbie Sakai, Sophie Archambeault, Leslie Chen, Ryan C Russell, Stephanie S Sybingco, Michael Ohh, Benjamin S Braun, Christian Flotho, and Mignon L Loh. Germline *CBL* mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. *Nature Genetics*, 42(9) :794–800, September 2010. ISSN 1061-4036, 1546-1718. doi : 10.1038/ng.641.
- [52] Neurofibromatosis Conference Statement *Arch Neurol*. 1988;45(5) :575-578. doi :10.1001/archneur.1988.00520290115023.
- [53] Andrew L. Lin and David H. Gutmann. Advances in the treatment of neurofibromatosis-associated tumours. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(11) :616–624, November 2013. ISSN 1759-4774, 1759-4782. doi : 10.1038/nrclinonc.2013.144.
- [54] M. Tartaglia, G. Zampino, and B. D. Gelb. Noonan syndrome : clinical aspects and molecular pathogenesis. *Molecular Syndromology*, 1(1) :2–26, February 2010. ISSN 1661-8777. doi : 10.1159/000276766.
- [55] Viviana Cordeddu, Elia Di Schiavi, Len A Pennacchio, Avi Ma'ayan, Anna Sarkozy, Valentina Fodale, Serena Cecchetti, Alessio Cardinale, Joel Martin, Wendy Schackwitz, Anna Lipzen, Giuseppe Zampino, Laura Mazzanti, Maria C Digilio, Simone Martinelli, Elisabetta Flex, Francesca Lepri, Deborah

Bartholdi, Kerstin Kutsche, Giovanni B Ferrero, Cecilia Anichini, Angelo Selicorni, Cesare Rossi, Romano Tenconi, Martin Zenker, Daniela Merlo, Bruno Dallapiccola, Ravi Iyengar, Paolo Bazzicalupo, Bruce D Gelb, and Marco Tartaglia. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nature Genetics*, 41(9) :1022–1026, September 2009. ISSN 1061-4036, 1546-1718. doi : 10.1038/ng.425.

- [56] Hilde Brems, Magdalena Chmara, Mourad Sahbatou, Ellen Denayer, Koji Taniguchi, Reiko Kato, Riet Somers, Ludwine Messiaen, Sofie De Schepper, Jean-Pierre Fryns, Jan Cools, Peter Marynen, Gilles Thomas, Akihiko Yoshimura, and Eric Legius. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1–like phenotype. *Nature Genetics*, 39(9) :1120–1126, September 2007. ISSN 1061-4036, 1546-1718. doi : 10.1038/ng2113.
- [57] Mino Battiwalla and A. John Barrett. Bone marrow mesenchymal stromal cells to treat complications following allogeneic stem cell transplantation. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 20(3) :211–217, June 2014. ISSN 1937-3376. doi : 10.1089/ten.TEB.2013.0566.
- [58] H. Castro-Malaspina, G. Schaison, S. Passe, A. Pasquier, R. Berger, C. Bayle-Weisgerber, D. Miller, M. Seligmann, and J. Bernard. Subacute and chronic myelomonocytic leukemia in children (juvenile CML). Clinical and hematologic observations, and identification of prognostic factors. *Cancer*, 54(4) : 675–686, August 1984. ISSN 0008-543X.
- [59] G. Owen, I. J. Lewis, M. Morgan, A. Robinson, and R. F. Stevens. Prognostic factors in juvenile chronic granulocytic leukaemia. *The British Journal of Cancer. Supplement*, 18 :S68–71, August 1992. ISSN 0306-9443.
- [60] Marion Strullu, Aurélie Caye, Julie Lachenaud, Bruno Cassinat, Steven Gazal, Odile Fenneteau, Nathalie Pouvreau, Sabrina Pereira, Clarisse Baumann, Audrey Contet, Nicolas Sirvent, Françoise Méchinaud, Isabelle Guellec, Dalila Adjaoud, Catherine Paillard, Corinne Alberti, Martin Zenker, Christine Chomienne, Yves Bertrand, André Baruchel, Alain Verloes, and Hélène Cavé. Juvenile myelomonocytic leukaemia and Noonan syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 51(10) :689–697, October 2014. ISSN 1468-6244. doi : 10.1136/jmedgenet-2014-102611.
- [61] Heather Mason-Suares, Diana Toledo, Jean Gekas, Katherine A. Lafferty, Naomi Meeks, M. Cristina Pacheco, David Sharpe, Thomas E. Mullen, and Matthew S. Lebo. Juvenile myelomonocytic leukemia-associated variants are associated with neo-natal lethal Noonan syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*, 25(4) :509–511, 2017. ISSN 1476-5438. doi : 10.1038/ejhg.2016.202.
- [62] L. E. Side, P. D. Emanuel, B. Taylor, J. Franklin, P. Thompson, R. P. Castleberry, and K. M. Shannon. Mutations of the NF1 gene in children with juvenile myelomonocytic leukemia without clinical evidence of neurofibromatosis, type 1. *Blood*, 92(1) :267–272, July 1998. ISSN 0006-4971.
- [63] Kevin M. Shannon, Peter O’Connell, George A. Martin, Dorothy Paderanga, Kristin Olson, Patricia Dinndorf, and Frank McCormick. Loss of The Normal NF1 Allele from the Bone Marrow of Children with Type 1 Neurofibromatosis and Malignant Myeloid Disorders. *New England Journal of*

Medicine, 330(9) :597–601, March 1994. ISSN 0028-4793, 1533-4406. doi : 10.1056/NEJM199403033300903.

- [64] Lucy Side, Brigit Taylor, Matthew Cayouette, Edward Conner, Patricia Thompson, Michael Luce, and Kevin Shannon. Homozygous Inactivation of the *NF1* Gene in Bone Marrow Cells from Children with Neurofibromatosis Type 1 and Malignant Myeloid Disorders. *New England Journal of Medicine*, 336(24) :1713–1720, June 1997. ISSN 0028-4793, 1533-4406. doi : 10.1056/NEJM199706123362404.
- [65] D. F. Easton, M. A. Ponder, S. M. Huson, and B. A. Ponder. An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1) : evidence for modifying genes. *American Journal of Human Genetics*, 53(2) :305–313, August 1993. ISSN 0002-9297.
- [66] Audrey Sabbagh, Eric Pasmant, Ingrid Laurendeau, Béatrice Parfait, Sébastien Barbarot, Bernard Guillot, Patrick Combemale, Salah Ferkal, Michel Vidaud, Patrick Aubourg, Dominique Vidaud, and Pierre Wolkenstein. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Human Molecular Genetics*, 18(15) :2768–2778, August 2009. ISSN 1460-2083, 0964-6906. doi : 10.1093/hmg/ddp212.
- [67] Hildegard Kehrer-Sawatzki, Victor-Felix Mautner, and David N. Cooper. Emerging genotype-phenotype relationships in patients with large *NF1* deletions. *Human Genetics*, 136(4) :349–376, 2017. ISSN 1432-1203. doi : 10.1007/s00439-017-1766-y.
- [68] Mignon L. Loh. Recent advances in the pathogenesis and treatment of juvenile myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 152(6) : 677–687, March 2011. ISSN 1365-2141. doi : 10.1111/j.1365-2141.2010.08525.x.
- [69] M Strullu, A Caye, B Cassinat, O Fenneteau, F Touzot, T Blauwblomme, R Rodriguez, S Latour, A Petit, V Barlogis, C Galambrun, T Leblanc, A Baruchel, C Chomienne, and H Cavé. In hematopoietic cells with a germline mutation of *CBL*, loss of heterozygosity is not a signature of juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*, 27(12) :2404–2407, December 2013. ISSN 0887-6924, 1476-5551. doi : 10.1038/leu.2013.203.
- [70] Elliot Stieglitz, Amaro N. Taylor-Weiner, Tiffany Y. Chang, Laura C. Gelston, Yong-Dong Wang, Tali Mazor, Emilio Esquivel, Ariel Yu, Sara Seepo, Scott Olsen, Mara Rosenberg, Sophie L. Archambeault, Ghada Abusin, Kyle Beckman, Patrick A. Brown, Michael Briones, Benjamin Carcamo, Todd Cooper, Gary V. Dahl, Peter D. Emanuel, Mark N. Fluchel, Rakesh K. Goyal, Robert J. Hayashi, Johann Hitzler, Christopher Hugge, Y. Lucy Liu, Yoav H. Messinger, Donald H. Mahoney, Philip Monteleone, Eneida R. Nemecek, Philip A. Roehrs, Reuven J. Schore, Kimo C. Stine, Clifford M. Takemoto, Jeffrey A. Toretsky, Joseph F. Costello, Adam B. Olshen, Chip Stewart, Yongjin Li, Jing Ma, Robert B. Gerbing, Todd A. Alonzo, Gad Getz, Tanja Gruber, Todd Golub, Kimberly Stegmaier, and Mignon L. Loh. The genomic landscape of juvenile myelomonocytic leukemia. *Nature Genetics*, 47(11) : 1326–1333, November 2015. ISSN 1546-1718. doi : 10.1038/ng.3400.

- [71] Amy P. Hsu, Elizabeth P. Sampaio, Javed Khan, Katherine R. Calvo, Jacob E. Lemieux, Smita Y. Patel, David M. Frucht, Donald C. Vinh, Roger D. Auth, Alexandra F. Freeman, Kenneth N. Olivier, Gulbu Uzel, Christa S. Zerbe, Christine Spalding, Stefania Pittaluga, Mark Raffeld, Douglas B. Kuhns, Li Ding, Michelle L. Paulson, Beatriz E. Marciano, Juan C. Gea-Banacloche, Jordan S. Orange, Jennifer Cuellar-Rodriguez, Dennis D. Hickstein, and Steven M. Holland. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood*, 118(10) :2653–2655, September 2011. ISSN 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2011-05-356352.
- [72] Elliot Stieglitz, Y. Lucy Liu, Peter D. Emanuel, Robert P. Castleberry, Todd M. Cooper, Kevin M. Shannon, and Mignon L. Loh. Mutations in GATA2 are rare in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, 123(9) :1426–1427, February 2014. ISSN 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2013-11-531079.
- [73] Nao Yoshida, Hiroshi Yagasaki, Yinyan Xu, Kazuyuki Matsuda, Ayami Yoshimi, Yoshiyuki Takahashi, Asahito Hama, Nobuhiro Nishio, Hideki Muramatsu, Nobuhiro Watanabe, Kimikazu Matsumoto, Koji Kato, Junichi Ueyama, Hiroko Inada, Hiroaki Goto, Miharuru Yabe, Kazuko Kudo, Junichi Mimaya, Akira Kikuchi, Atsushi Manabe, Kenichi Koike, and Seiji Kojima. Correlation of Clinical Features With the Mutational Status of GM-CSF Signaling Pathway-Related Genes in Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Pediatric Research*, 65(3) :334–340, March 2009. ISSN 0031-3998, 1530-0447. doi : 10.1203/PDR.0b013e3181961d2a.
- [74] K. Matsuda, A. Shimada, N. Yoshida, A. Ogawa, A. Watanabe, S. Yajima, S. Iizuka, K. Koike, F. Yanai, K. Kawasaki, M. Yanagimachi, A. Kikuchi, Y. Ohtsuka, E. Hidaka, K. Yamauchi, M. Tanaka, R. Yanagisawa, Y. Nakazawa, M. Shiohara, A. Manabe, S. Kojima, and K. Koike. Spontaneous improvement of hematologic abnormalities in patients having juvenile myelomonocytic leukemia with specific RAS mutations. *Blood*, 109(12) :5477–5480, June 2007. ISSN 0006-4971, 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2006-09-046649.
- [75] C. Flotho, C. P. Kratz, E. Bergstrasser, H. Hasle, J. Stary, M. Trebo, M. M. van den Heuvel-Eibrink, D. Wojcik, M. Zecca, F. Locatelli, C. M. Niemeyer, and on behalf of the European Working Group of Myelodysplastic Syndromes in Childhood. Genotype-phenotype correlation in cases of juvenile myelomonocytic leukemia with clonal RAS mutations. *Blood*, 111(2) :966–967, January 2008. ISSN 0006-4971, 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2007-09-111831.
- [76] Abdulrahman Alsultan, Mohamed Khalifah, and Abdulkarim A. Alrabiaah. Spontaneous Remission of Juvenile Myelomonocytic Leukemia with NRAS Mutation. *Pediatric Hematology and Oncology*, 29(7) :624–626, September 2012. ISSN 0888-0018, 1521-0669. doi : 10.3109/08880018.2012.710299.
- [77] Katherine R. Calvo, Susan Price, Raul C. Braylan, Joao Bosco Oliveira, Michael Lenardo, Thomas A. Fleisher, and V. Koneti Rao. JMML and RALD (Ras-associated autoimmune leukoproliferative disorder) : common genetic etiology yet clinically distinct entities. *Blood*, 125(18) :2753–2758, April 2015. ISSN 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2014-11-567917.

- [78] F. Locatelli and C. M. Niemeyer. How I treat juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, 125(7) :1083–1090, February 2015. ISSN 0006-4971, 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2014-08-550483.
- [79] for the MDS Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology, A Manabe, J Okamura, K Yumura-Yagi, Y Akiyama, M Sako, H Uchiyama, S Kojima, K Koike, T Saito, and T Nakahata. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for 27 children with juvenile myelomonocytic leukemia diagnosed based on the criteria of the International JMML Working Group. *Leukemia*, 16(4) :645–649, April 2002. ISSN 0887-6924, 1476-5551. doi : 10.1038/sj.leu.2402407.
- [80] Franco Locatelli, Peter Nöllke, Marco Zecca, Elisabeth Korthof, Edoardo Lanino, Christina Peters, Andrea Pession, Hartmut Kabisch, Cornelio Uderzo, Carmen S. Bonfim, Peter Bader, Dagmar Dilloo, Jan Stary, Alexandra Fischer, Tom Révész, Monika Führer, Henrik Hasle, Monika Trebo, Marry M. van den Heuvel-Eibrink, Susanna Fenu, Brigitte Strahm, Giovanna Giorgiani, Mario Regazzi Bonora, Ulrich Duffner, Charlotte M. Niemeyer, European Working Group on Childhood MDS, and European Blood and Marrow Transplantation Group. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) : results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood*, 105(1) :410–419, January 2005. ISSN 0006-4971. doi : 10.1182/blood-2004-05-1944.
- [81] F. Locatelli, A. Crotta, A. Ruggeri, M. Eapen, J. E. Wagner, M. L. MacMillan, M. Zecca, J. Kurtzberg, C. Bonfim, A. Vora, C. Diaz de Heredia, L. Teague, J. Stein, T. A. O'Brien, H. Bittencourt, A. Madureira, B. Strahm, C. Peters, C. Niemeyer, E. Gluckman, and V. Rocha. Analysis of risk factors influencing outcomes after cord blood transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia : a EUROCORD, EBMT, EWOG-MDS, CIBMTR study. *Blood*, 122(12) :2135–2141, September 2013. ISSN 0006-4971, 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2013-03-491589.
- [82] Nicoletta Coccaro, Giuseppina Tota, Antonella Zagaria, Luisa Anelli, Giorgina Specchia, and Francesco Albano. SETBP1 dysregulation in congenital disorders and myeloid neoplasms. *Oncotarget*, 8(31) :51920–51935, August 2017. ISSN 1949-2553. doi : 10.18632/oncotarget.17231.
- [83] Aurélie Caye, Marion Strullu, Fabien Guidez, Bruno Cassinat, Steven Gazal, Odile Fenneteau, Elodie Lainey, Kazem Nouri, Saeideh Nakhaei-Rad, Radvan Dvorsky, Julie Lachenaud, Sabrina Pereira, Jocelyne Vivent, Emmanuelle Verger, Dominique Vidaud, Claire Galambrun, Capucine Picard, Arnaud Petit, Audrey Contet, Marilyn Poirée, Nicolas Sirvent, Françoise Méchinaud, Dalila Adjaoud, Catherine Paillard, Brigitte Nelken, Yves Reguerre, Yves Bertrand, Dieter Häussinger, Jean-Hugues Dalle, Mohammad Reza Ahmadian, André Baruchel, Christine Chomienne, and Hélène Cavé. Juvenile myelomonocytic leukemia displays mutations in components of the RAS pathway and the PRC2 network. *Nature Genetics*, 47(11) :1334–1340, November 2015. ISSN 1546-1718. doi : 10.1038/ng.3420.
- [84] Cynthia L. Fisher, Nicolas Pineault, Christy Brookes, Cheryl D. Helgason, Hideaki Ohta, Caroline Bodner, Jay L. Hess, R. Keith Humphries, and Hugh W. Brock. Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or

- leukemia. *Blood*, 115(1) :38–46, January 2010. ISSN 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2009-07-230698.
- [85] Goro Sashida, Motohiko Oshima, and Atsushi Iwama. Deregulated Polycomb functions in myeloproliferative neoplasms. *International Journal of Hematology*, January 2019. ISSN 0925-5710, 1865-3774. doi : 10.1007/s12185-019-02600-6.
- [86] Raphaël Margueron and Danny Reinberg. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330) :343–349, January 2011. ISSN 0028-0836, 1476-4687. doi : 10.1038/nature09784.
- [87] Raphaël Margueron and Danny Reinberg. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330) :343–349, January 2011. ISSN 0028-0836, 1476-4687. doi : 10.1038/nature09784.
- [88] Raphael Margueron, Guohong Li, Kavitha Sarma, Alexandre Blais, Jiri Zavadil, Christopher L. Woodcock, Brian D. Dynlacht, and Danny Reinberg. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Molecular Cell*, 32(4) :503–518, November 2008. ISSN 1097-4164. doi : 10.1016/j.molcel.2008.11.004.
- [89] Ru Cao and Yi Zhang. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Molecular Cell*, 15(1) :57–67, July 2004. ISSN 1097-2765. doi : 10.1016/j.molcel.2004.06.020.
- [90] Xiaohua Shen, Woojin Kim, Yuko Fujiwara, Matthew D. Simon, Yingchun Liu, Matthew R. Mysliwiec, Guo-Cheng Yuan, Youngsook Lee, and Stuart H. Orkin. Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells. *Cell*, 139(7) :1303–1314, December 2009. ISSN 1097-4172. doi : 10.1016/j.cell.2009.12.003.
- [91] Jamy C. Peng, Anton Valouev, Tomek Swigut, Junmei Zhang, Yingming Zhao, Arend Sidow, and Joanna Wysocka. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell*, 139(7) :1290–1302, December 2009. ISSN 1097-4172. doi : 10.1016/j.cell.2009.12.002.
- [92] Gang Li, Raphael Margueron, Manching Ku, Pierre Chambon, Bradley E. Bernstein, and Danny Reinberg. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes & Development*, 24(4) :368–380, February 2010. ISSN 1549-5477. doi : 10.1101/gad.1886410.
- [93] Maxim Nekrasov, Tetyana Klymenko, Sven Fraterman, Bernadett Papp, Katarzyna Oktaba, Thomas Köcher, Adrian Cohen, Hendrik G. Stunnenberg, Matthias Wilm, and Jürg Müller. Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *The EMBO journal*, 26(18) :4078–4088, September 2007. ISSN 0261-4189. doi : 10.1038/sj.emboj.7601837.
- [94] Yongqing Liu, Shumeng Liu, Shuai Yuan, Huajing Yu, Yu Zhang, Xiaohan Yang, Guojia Xie, Zhe Chen, Wanjin Li, Bosen Xu, Luyang Sun, Yongfeng

- Shang, and Jing Liang. Chromodomain protein CDYL is required for transmission/restoration of repressive histone marks. *Journal of Molecular Cell Biology*, 9(3) :178–194, 2017. ISSN 1759-4685. doi : 10.1093/jmcb/mjx013.
- [95] Jiapeng Wang, Zhaomin Li, Yongzheng He, Feng Pan, Shi Chen, Steven Rhodes, Lihn Nguyen, Jin Yuan, Li Jiang, Xianlin Yang, Ophelia Weeks, Ziyue Liu, Jiehao Zhou, Hongyu Ni, Chen-Leng Cai, Mingjiang Xu, and Feng-Chun Yang. Loss of *Asxl1* leads to myelodysplastic syndrome-like disease in mice. *Blood*, 123(4) :541–553, January 2014. ISSN 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2013-05-500272.
- [96] Daichi Inoue, Masaki Matsumoto, Reina Nagase, Makoto Saika, Takeshi Fujino, Keiichi I. Nakayama, and Toshio Kitamura. Truncation mutants of *ASXL1* observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels. *Experimental Hematology*, 44(3) :172–176.e1, March 2016. ISSN 1873-2399. doi : 10.1016/j.exphem.2015.11.011.
- [97] Omar Abdel-Wahab, Mazhar Adli, Lindsay M. LaFave, Jie Gao, Todd Hricik, Alan H. Shih, Suveg Pandey, Jay P. Patel, Young Rock Chung, Richard Koche, Fabiana Perna, Xinyang Zhao, Jordan E. Taylor, Christopher Y. Park, Martin Carroll, Ari Melnick, Stephen D. Nimer, Jacob D. Jaffe, Iannis Aifantis, Bradley E. Bernstein, and Ross L. Levine. *ASXL1* mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell*, 22(2) :180–193, August 2012. ISSN 1878-3686. doi : 10.1016/j.ccr.2012.06.032.
- [98] Silvia Bresolin, Marco Zecca, Christian Flotho, Luca Trentin, Andrea Zangrando, Laura Sainati, Jan Stary, Barbara de Moerloose, Henrik Hasle, Charlotte M. Niemeyer, Geertruy te Kronnie, Franco Locatelli, and Giuseppe Basso. Gene Expression–Based Classification As an Independent Predictor of Clinical Outcome in Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 28(11) :1919–1927, April 2010. ISSN 0732-183X, 1527-7755. doi : 10.1200/JCO.2009.24.4426.
- [99] C. Olk-Batz, A. R. Poetsch, P. Nollke, R. Claus, M. Zucknick, I. Sandrock, T. Witte, B. Strahm, H. Hasle, M. Zecca, J. Stary, E. Bergstraesser, B. De Moerloose, M. Trebo, M. M. van den Heuvel-Eibrink, D. Wojcik, F. Locatelli, C. Plass, C. M. Niemeyer, C. Flotho, and the European Working Group of Myelodysplastic Syndromes in Childhood (EWOG-MDS). Aberrant DNA methylation characterizes juvenile myelomonocytic leukemia with poor outcome. *Blood*, 117(18) :4871–4880, May 2011. ISSN 0006-4971, 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2010-08-298968.
- [100] Hirotohi Sakaguchi, Hideki Muramatsu, Yusuke Okuno, Hideki Makishima, Yinyan Xu, Yoko Furukawa-Hibi, Xinan Wang, Atsushi Narita, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, Sayoko Doisaki, Nao Yoshida, Asahito Hama, Yoshiyuki Takahashi, Kiyofumi Yamada, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Jaroslaw P. Maciejewski, and Seiji Kojima. Aberrant DNA Methylation Is Associated with a Poor Outcome in Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *PloS One*, 10(12) :e0145394, 2015. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0145394.
- [101] Anna R. Poetsch, Daniel B. Lipka, Tania Witte, Rainer Claus, Peter Nöllke, Manuela Zucknick, Christiane Olk-Batz, Silvia Fluhr, Michael Dworzak, Barbara De Moerloose, Jan Stary, Marco Zecca, Henrik Hasle, Mar-

- kus Schmugge, Marry M. van den Heuvel-Eibrink, Franco Locatelli, Charlotte M. Niemeyer, Christian Flotho, and Christoph Plass. RASA4 undergoes DNA hypermethylation in resistant juvenile myelomonocytic leukemia. *Epigenetics*, 9(9) :1252–1260, September 2014. ISSN 1559-2308. doi : 10.4161/epi.29941.
- [102] X. Lin, P. Nelson, and I. H. Gelman. SSeCKS, a major protein kinase C substrate with tumor suppressor activity, regulates G(1)→S progression by controlling the expression and cellular compartmentalization of cyclin D. *Molecular and Cellular Biology*, 20(19) :7259–7272, October 2000. ISSN 0270-7306. doi : 10.1128/mcb.20.19.7259-7272.2000.
- [103] Silvia Fluhr, Christopher Felix Krombholz, Angelina Meier, Thomas Epting, Oliver Mücke, Christoph Plass, Charlotte M. Niemeyer, and Christian Flotho. Epigenetic dysregulation of the erythropoietic transcription factor KLF1 and the beta-like globin locus in juvenile myelomonocytic leukemia. *Epigenetics*, 12(8) :715–723, 2017. ISSN 1559-2308. doi : 10.1080/15592294.2017.1356959.
- [104] Daniel B. Lipka, Tania Witte, Reka Toth, Jing Yang, Manuel Wiesenfarth, Peter Nöllke, Alexandra Fischer, David Brocks, Zuguang Gu, Jeongbin Park, Brigitte Strahm, Marcin Wlodarski, Ayami Yoshimi, Rainer Claus, Michael Lübbert, Hauke Busch, Melanie Boerries, Mark Hartmann, Maximilian Schöning, Umut Kilik, Jens Langstein, Justyna A. Wierzbinska, Caroline Pabst, Swati Garg, Albert Catalá, Barbara De Moerloose, Michael Dworzak, Henrik Hasle, Franco Locatelli, Riccardo Masetti, Markus Schmugge, Owen Smith, Jan Stary, Marek Ussowicz, Marry M. van den Heuvel-Eibrink, Yassen Assenov, Matthias Schlesner, Charlotte Niemeyer, Christian Flotho, and Christoph Plass. RAS-pathway mutation patterns define epigenetic subclasses in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nature Communications*, 8(1) :2126, 2017. ISSN 2041-1723. doi : 10.1038/s41467-017-02177-w.
- [105] Elliot Stieglitz, Tali Mazor, Adam B. Olshen, Huimin Geng, Laura C. Gelston, Jon Akutagawa, Daniel B. Lipka, Christoph Plass, Christian Flotho, Farid F. Chehab, Benjamin S. Braun, Joseph F. Costello, and Mignon L. Loh. Genome-wide DNA methylation is predictive of outcome in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nature Communications*, 8(1) :2127, 2017. ISSN 2041-1723. doi : 10.1038/s41467-017-02178-9.
- [106] Norihiro Murakami, Yusuke Okuno, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, Genta Nagae, Kyogo Suzuki, Atsushi Narita, Hirotoshi Sakaguchi, Nozomu Kawashima, Xinan Wang, Yinyan Xu, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Asahito Hama, Masashi Sanada, Masafumi Ito, Masashi Hirayama, Arata Watanabe, Toshihide Ueno, Seiji Kojima, Hiroyuki Aburatani, Hiroyuki Mano, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Yoshiyuki Takahashi, and Hideki Muramatsu. Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, 131(14) :1576–1586, April 2018. ISSN 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2017-07-798157.
- [107] Hetty H. Helmoortel, Silvia Bresolin, Tim Lammens, Hélène Cavé, Peter Noellke, Aurélie Caye, Farzaneh Ghazavi, Andrica de Vries, Henrik Hasle, Veerle Labarque, Riccardo Masetti, Jan Stary, Marry M. van den Heuvel-Eibrink, Jan Philippé, Nadine Van Roy, Yves Benoit, Frank Speleman, Charlotte Niemeyer, Christian Flotho, Giuseppe Basso, Geertruy Te Kronnie,

- Pieter Van Vlierberghe, and Barbara De Moerloose. LIN28b overexpression defines a novel fetal-like subgroup of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, 127(9) :1163–1172, March 2016. ISSN 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2015-09-667808.
- [108] V. Ambros and H. R. Horvitz. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 226(4673) :409–416, October 1984. ISSN 0036-8075, 1095-9203. doi : 10.1126/science.6494891.
- [109] Eric G Moss, Rosalind C Lee, and Victor Ambros. The Cold Shock Domain Protein LIN-28 Controls Developmental Timing in *C. elegans* and Is Regulated by the *lin-4* RNA. *Cell*, 88(5) :637–646, March 1997. ISSN 0092-8674. doi : 10.1016/S0092-8674(00)81906-6.
- [110] Hosuk Lee, Sungwook Han, Chang Seob Kwon, and Daeyoup Lee. Biogenesis and regulation of the *let-7* miRNAs and their functional implications. *Protein & Cell*, 7(2) :100–113, February 2016. ISSN 1674-8018. doi : 10.1007/s13238-015-0212-y.
- [111] Inha Heo, Chirlmin Joo, Jun Cho, Minju Ha, Jinju Han, and V. Narry Kim. Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of *let-7* Precursor MicroRNA. *Molecular Cell*, 32(2) :276–284, October 2008. ISSN 1097-2765. doi : 10.1016/j.molcel.2008.09.014.
- [112] John P. Hagan, Elena Piskounova, and Richard I. Gregory. Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit *let-7* maturation in mouse embryonic stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(10) :1021–1025, October 2009. ISSN 1545-9985. doi : 10.1038/nsmb.1676.
- [113] Inha Heo, Chirlmin Joo, Young-Kook Kim, Minju Ha, Mi-Jeong Yoon, Jun Cho, Kyu-Hyeon Yeom, Jinju Han, and V. Narry Kim. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell*, 138(4) :696–708, August 2009. ISSN 1097-4172. doi : 10.1016/j.cell.2009.08.002.
- [114] James E. Thornton and Richard I. Gregory. How does Lin28 *let-7* control development and disease? *Trends in Cell Biology*, 22(9) :474–482, September 2012. ISSN 1879-3088. doi : 10.1016/j.tcb.2012.06.001.
- [115] Hiroshi I. Suzuki, Akihiro Katsura, and Kohei Miyazono. A role of uridylation pathway for blockade of *let-7* microRNA biogenesis by Lin28b. *Cancer Science*, 106(9) :1174–1181, September 2015. ISSN 13479032. doi : 10.1111/cas.12721.
- [116] Seung-Kyoon Kim, Hosuk Lee, Kyumin Han, Sang Cheol Kim, Yoonjung Choi, Sang-Wook Park, Geunu Bak, Younghoon Lee, Jung Kyoon Choi, Tae-Kyung Kim, Yong-Mahn Han, and Daeyoup Lee. SET7/9 methylation of the pluripotency factor LIN28a is a nucleolar localization mechanism that blocks *let-7* biogenesis in human ESCs. *Cell Stem Cell*, 15(6) :735–749, December 2014. ISSN 1875-9777. doi : 10.1016/j.stem.2014.10.016.
- [117] Srinivas R. Viswanathan, John T. Powers, William Einhorn, Yujin Hoshida, Tony L. Ng, Sara Toffanin, Maureen O’Sullivan, Jun Lu, Letha A. Phillips, Victoria L. Lockhart, Samar P. Shah, Pradeep S. Tanwar, Craig H. Mermel, Rameen Beroukhim, Mohammad Azam, Jose Teixeira, Matthew Meyerson,

- Timothy P. Hughes, Josep M. Llovet, Jerald Radich, Charles G. Mullighan, Todd R. Golub, Poul H. Sorensen, and George Q. Daley. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nature Genetics*, 41(7) :843–848, July 2009. ISSN 1546-1718. doi : 10.1038/ng.392.
- [118] Masashi Narita, Masako Narita, Valery Krizhanovsky, Sabrina Nuñez, Agustín Chicas, Stephen A. Hearn, Michael P. Myers, and Scott W. Lowe. A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell*, 126(3) :503–514, August 2006. ISSN 0092-8674. doi : 10.1016/j.cell.2006.05.052.
- [119] Alfredo Fusco and Monica Fedele. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 7(12) :899–910, December 2007. ISSN 1474-1768. doi : 10.1038/nrc2271.
- [120] Thomas V. O. Hansen, Niels A. Hammer, Jacob Nielsen, Mette Madsen, Charlotte Dalbaeck, Ulla M. Wewer, Jan Christiansen, and Finn C. Nielsen. Dwarfism and Impaired Gut Development in Insulin-Like Growth Factor II mRNA-Binding Protein 1-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10) :4448–4464, May 2004. ISSN 0270-7306. doi : 10.1128/MCB.24.10.4448-4464.2004.
- [121] Hao Zhu, Samar Shah, Ng Shyh-Chang, Gen Shinoda, William S. Einhorn, Srinivas R. Viswanathan, Ayumu Takeuchi, Corinna Grasmann, John L. Rinn, Mary F. Lopez, Joel N. Hirschhorn, Mark R. Palmert, and George Q. Daley. Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies. *Nature Genetics*, 42(7) :626–630, July 2010. ISSN 1546-1718. doi : 10.1038/ng.593.
- [122] Hao Zhu, Ng Shyh-Chang, Ayellet V. Segrè, Gen Shinoda, Samar P. Shah, William S. Einhorn, Ayumu Takeuchi, Jesse M. Engreitz, John P. Hagan, Michael G. Kharas, Achia Urbach, James E. Thornton, Robinson Triboulet, Richard I. Gregory, DIAGRAM Consortium, MAGIC Investigators, David Altshuler, and George Q. Daley. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell*, 147(1) :81–94, September 2011. ISSN 1097-4172. doi : 10.1016/j.cell.2011.08.033.
- [123] Chi V. Dang, Kathryn A. O'Donnell, Karen I. Zeller, Tam Nguyen, Rebecca C. Osthus, and Feng Li. The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology*, 16(4) :253–264, August 2006. ISSN 1044-579X. doi : 10.1016/j.semcan.2006.07.014.
- [124] Barbara Hoffman, Arshad Amanullah, Marianna Shafarenko, and Dan A. Liebermann. The proto-oncogene c- myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene*, 21(21) :3414–3421, May 2002. ISSN 1476-5594. doi : 10.1038/sj.onc.1205400.
- [125] Yingqun Huang. A mirror of two faces : Lin28 as a master regulator of both miRNA and mRNA. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 3(4) :483–494, August 2012. ISSN 1757-7012. doi : 10.1002/wrna.1112.
- [126] Dong Hua Yang and Eric G. Moss. Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene expression patterns : GEP*, 3(6) :719–726, December 2003. ISSN 1567-133X. doi : 10.1016/s1567-133x(03)00140-6.

- [127] Michael R. Copley and Connie J. Eaves. Developmental changes in hematopoietic stem cell properties. *Experimental & Molecular Medicine*, 45 :e55, November 2013. ISSN 2092-6413. doi : 10.1038/emm.2013.98.
- [128] Joan Yuan, Cuong K. Nguyen, Xiuhuai Liu, Chrysi Kanellopoulou, and Stefan A. Muljo. Lin28b Reprograms Adult Bone Marrow Hematopoietic Progenitors to Mediate Fetal-Like Lymphopoiesis. *Science*, 335(6073) :1195–1200, March 2012. ISSN 0036-8075, 1095-9203. doi : 10.1126/science.1216557.
- [129] Seung-Jae Noh, Samuel H. Miller, Y. Terry Lee, Sung-Ho Goh, Francesco M. Marincola, David F. Stroncek, Christopher Reed, Ena Wang, and Jeffery L. Miller. Let-7 microRNAs are developmentally regulated in circulating human erythroid cells. *Journal of Translational Medicine*, 7 :98, November 2009. ISSN 1479-5876. doi : 10.1186/1479-5876-7-98.
- [130] Y. Terry Lee, Jaira F. de Vasconcellos, Joan Yuan, Colleen Byrnes, Seung-Jae Noh, Emily R. Meier, Ki Soon Kim, Antoinette Rabel, Megha Kaushal, Stefan A. Muljo, and Jeffery L. Miller. LIN28b-mediated expression of fetal hemoglobin and production of fetal-like erythrocytes from adult human erythroblasts ex vivo. *Blood*, 122(6) :1034–1041, August 2013. ISSN 0006-4971, 1528-0020. doi : 10.1182/blood-2012-12-472308.
- [131] Vijay G. Sankaran, Tobias F. Menne, Jian Xu, Thomas E. Akie, Guillaume Lettre, Ben Van Handel, Hanna K. A. Mikkola, Joel N. Hirschhorn, Alan B. Cantor, and Stuart H. Orkin. Human Fetal Hemoglobin Expression Is Regulated by the Developmental Stage-Specific Repressor *BCL11A*. *Science*, 322(5909) :1839–1842, December 2008. ISSN 0036-8075, 1095-9203. doi : 10.1126/science.1165409.
- [132] Ilana Carmel-Gross, Naomi Bollag, Leah Armon, and Achia Urbach. LIN28 : A Stem Cell Factor with a Key Role in Pediatric Tumor Formation. *Stem Cells and Development*, 25(5) :367–377, March 2016. ISSN 1557-8534. doi : 10.1089/scd.2015.0322.
- [133] Shuping Peng, Ling-Ling Chen, Xin-Xiang Lei, Li Yang, Haifan Lin, Gordon G. Carmichael, and Yingqun Huang. Genome-wide studies reveal that Lin28 enhances the translation of genes important for growth and survival of human embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 29(3) :496–504, March 2011. ISSN 1549-4918. doi : 10.1002/stem.591.
- [134] Aurélie Caye, Kevin Rouault-Pierre, Marion Strullu, Elodie Lainey, Ander Abarrategi, Odile Fenneteau, Chloé Arfeuille, Jennifer Osman, Bruno Casinat, Sabrina Pereira, Fernando Anjos-Afonso, Erin Currie, Linda Ariza-McNaughton, Vincent Barlogis, Jean-Hugues Dalle, André Baruchel, Christine Chomienne, Hélène Cavé, and Dominique Bonnet. Despite mutation acquisition in hematopoietic stem cells, JMML-propagating cells are not always restricted to this compartment. *Leukemia*, pages 1–11, November 2019. ISSN 1476-5551. doi : 10.1038/s41375-019-0662-y.
- [135] A. E. Reif and J. M. Allen. IMMUNOLOGICAL DISTINCTION OF AKR THYMOCYTES. *Nature*, 203 :886–887, August 1964. ISSN 0028-0836.
- [136] Thomas H. Barker, Hernan E. Grenett, Mark W. MacEwen, Samuel G. Tilden, Gerald M. Fuller, Jeffrey Settleman, Anne Woods, Joanne Murphy-Ullrich, and James S. Hagood. Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions,

cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 Rho-GAP and Rho GTPase activity. *Experimental Cell Research*, 295(2) :488–496, May 2004. ISSN 0014-4827. doi : 10.1016/j.yexcr.2004.01.026.

- [137] Thomas H. Barker and James S. Hagood. Getting a grip on Thy-1 signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(5) :921–923, May 2009. ISSN 0006-3002. doi : 10.1016/j.bbamcr.2008.10.004.
- [138] Muhammad Vaseem Shaikh, Manika Kala, and Manish Nivsarkar. CD90 a potential cancer stem cell marker and a therapeutic target. *Cancer Biomarkers : Section A of Disease Markers*, 16(3) :301–307, 2016. ISSN 1875-8592. doi : 10.3233/CBM-160590.
- [139] Atul Kumar, Anshuman Bhanja, Jina Bhattacharyya, and Bithiah Grace Jaganathan. Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9) :11611–11622, September 2016. ISSN 1423-0380. doi : 10.1007/s13277-016-5112-0.
- [140] Roger J. Morris. Thy-1, a Pathfinder Protein for the Post-genomic Era. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6 :173, 2018. ISSN 2296-634X. doi : 10.3389/fcell.2018.00173.
- [141] Ping Hu and Thomas H. Barker. Thy-1 in Integrin Mediated Mechanotransduction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, February 2019. ISSN 2296-634X. doi : 10.3389/fcell.2019.00022.
- [142] Jonathan Cooper and Filippo G. Giancotti. Integrin Signaling in Cancer : Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell*, 35(3) :347–367, March 2019. ISSN 15356108. doi : 10.1016/j.ccell.2019.01.007.
- [143] Lisette Leyton, Pascal Schneider, Cecilia V. Labra, Curzio Rüegg, Claudio A. Hetz, Andrew F.G. Quest, and Claude Bron. Thy-1 binds to integrin beta 3 on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. *Current Biology*, 11(13) :1028–1038, July 2001. ISSN 09609822. doi : 10.1016/S0960-9822(01)00262-7.
- [144] Tamara Hermosilla, Daniel Muñoz, Rodrigo Herrera-Molina, Alejandra Valdivia, Nicolás Muñoz, Sang-Uk Nham, Pascal Schneider, Keith Burridge, Andrew F.G. Quest, and Lisette Leyton. Direct Thy-1 α v beta3 integrin interaction mediates neuron to astrocyte communication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(6) :1111–1120, June 2008. ISSN 01674889. doi : 10.1016/j.bbamcr.2008.01.034.
- [145] Yong Zhou, James S. Hagood, Baogen Lu, W. David Merryman, and Joanne E. Murphy-Ullrich. Thy-1-Integrin α_v beta $_5$ Interactions Inhibit Lung Fibroblast Contraction-induced Latent Transforming Growth Factor- β 1 Activation and Myofibroblast Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29) :22382–22393, July 2010. ISSN 0021-9258, 1083-351X. doi : 10.1074/jbc.M110.126227.
- [146] Vincent F. Fiore, Lining Ju, Yunfeng Chen, Cheng Zhu, and Thomas H. Barker. Dynamic catch of a Thy-1– α_5 beta $_1$ +syndecan-4 trimolecular

complex. *Nature Communications*, 5(1) :4886, December 2014. ISSN 2041-1723. doi : 10.1038/ncomms5886.

- [147] Jeongsuk Choi, Lisette Leyton, and Sang-Uk Nham. Characterization of alphaX I-domain binding to Thy-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(2) :557–561, June 2005. ISSN 0006-291X. doi : 10.1016/j.bbrc.2005.04.006.
- [148] Anne Wetzel, Triantafyllos Chavakis, Klaus T. Preissner, Michael Sticherling, Uwe-Frithjof Haustein, Ulf Anderegg, and Anja Saalbach. Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(6) :3850–3859, March 2004. ISSN 0022-1767. doi : 10.4049/jimmunol.172.6.3850.
- [149] Aleksis Isomursu, Martina Lerche, Maria E. Taskinen, Johanna Ivaska, and Emilia Peuhu. Integrin signaling and mechanotransduction in regulation of somatic stem cells. *Experimental Cell Research*, 378(2) :217–225, May 2019. ISSN 00144827. doi : 10.1016/j.yexcr.2019.01.027.
- [150] Jun Seita and Irving L. Weissman. Hematopoietic stem cell : self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 2(6) :640–653, December 2010. ISSN 1939-005X. doi : 10.1002/wsbm.86.
- [151] Gaël Millot. *Comprendre et réaliser les tests statistiques à l'aide de R : manuel de biostatistique*. Hors collection Sciences. DE BOECK SUP, Paris, 4e édition edition, January 2018. ISBN 978-2-8073-0291-4.
- [152] Zhonghan Li, Jason Dang, Kung-Yen Chang, and Tariq M. Rana. MicroRNA-mediated regulation of extracellular matrix formation modulates somatic cell reprogramming. *RNA (New York, N.Y.)*, 20(12) :1900–1915, December 2014. ISSN 1469-9001. doi : 10.1261/rna.043745.113.
- [153] James S. Hagood. Thy-1 as an Integrator of Diverse Extracellular Signals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7 :26, 2019. ISSN 2296-634X. doi : 10.3389/fcell.2019.00026.
- [154] H. Mayani and P. M. Lansdorp. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood*, 83(9) :2410–2417, May 1994. ISSN 0006-4971.
- [155] Francesco Buccisano, Francesca Maria Rossi, Adriano Venditti, Giovanni Del Poeta, Maria Christina Cox, Elisabetta Abbruzzese, Maurizio Ruppolo, Massimiliano Berretta, Massimo Degan, Stefania Russo, Anna Tamburini, Luca Maurillo, Maria Ilaria Del Principe, Massimiliano Postorino, Sergio Amadori, and Valter Gattei. CD90/Thy-1 is preferentially expressed on blast cells of high risk acute myeloid leukaemias. *British Journal of Haematology*, 125(2) :203–212, April 2004. ISSN 0007-1048. doi : 10.1111/j.1365-2141.2004.04883.x.
- [156] Antonieta Chávez-González, Elisa Dorantes-Acosta, Dafne Moreno-Lorenzana, Antonio Alvarado-Moreno, Lourdes Arriaga-Pizano, and Héctor Mayani. Expression of CD90, CD96, CD117, and CD123 on Different Hematopoietic Cell Populations from Pediatric Patients with Acute Myeloid

Leukemia. *Archives of Medical Research*, 45(4) :343–350, May 2014. ISSN 0188-4409. doi : 10.1016/j.arcmed.2014.04.001.

- [157] A. Blair, D. E. Hogge, L. E. Ailles, P. M. Lansdorp, and H. J. Sutherland. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood*, 89(9) :3104–3112, May 1997. ISSN 0006-4971.
- [158] Ketao Zhang, Siyao Che, Zheng Su, Shangyou Zheng, Huayao Zhang, Shangling Yang, Wenda Li, and Jianping Liu. CD90 promotes cell migration, viability and sphere-forming ability of hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(2) :946–954, February 2018. ISSN 1791-244X. doi : 10.3892/ijmm.2017.3314.
- [159] Gentao Liu, Xiangpeng Yuan, Zhaohui Zeng, Patrizia Tunici, Hiushan Ng, Iman R. Abdulkadir, Lizhi Lu, Dwain Irvin, Keith L. Black, and John S. Yu. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*, 5 :67, December 2006. ISSN 1476-4598. doi : 10.1186/1476-4598-5-67.
- [160] Ping Wang, Quanli Gao, Zhenhe Suo, Else Munthe, Steinar Solberg, Liwei Ma, Mengyu Wang, Nomdo Anton Christiaan Westerdaal, Gunnar Kvalheim, and Gustav Gaudernack. Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines. *PloS One*, 8(3) :e57020, 2013. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0057020.
- [161] Kathleen Schubert, Danny Gutknecht, Margarethe Köberle, Ulf Anderegg, and Anja Saalbach. Melanoma Cells Use Thy-1 (CD90) on Endothelial Cells for Metastasis Formation. *The American Journal of Pathology*, 182(1) :266–276, January 2013. ISSN 00029440. doi : 10.1016/j.ajpath.2012.10.003.
- [162] H. Gabra, J. E. Watson, K. J. Taylor, J. Mackay, R. C. Leonard, C. M. Steel, D. J. Porteous, and J. F. Smyth. Definition and refinement of a region of loss of heterozygosity at 11q23.3-q24.3 in epithelial ovarian cancer associated with poor prognosis. *Cancer Research*, 56(5) :950–954, March 1996. ISSN 0008-5472.
- [163] Henning C. Fiegel, Jussuf T. Kaifi, Alexander Quaas, Emine Varol, Annika Krickhahn, Roman Metzger, Guido Sauter, Holger Till, Jakob R. Izbicki, Rudolf Erttmann, and Dietrich Kluth. Lack of Thy1 (CD90) expression in neuroblastomas is correlated with impaired survival. *Pediatric Surgery International*, 24(1) :101–105, January 2008. ISSN 0179-0358. doi : 10.1007/s00383-007-2033-4.
- [164] Vikram Agarwal, George W Bell, Jin-Wu Nam, and David P Bartel. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, 4, August 2015. ISSN 2050-084X. doi : 10.7554/eLife.05005.

Titre (français) : Intérêt de l'expression du CD90 dans le pronostic des LMMJ.

Résumé (français) : La Leucémie Myélo-Monocytaire Juvénile (LMMJ) est une hémopathie chronique de l'enfant avec prolifération excessive de la lignée myélo-monocytaire. Il existe une hétérogénéité pronostique importante entre des formes indolentes, et des formes agressives qui nécessitent une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. La découverte de nouveaux facteurs pronostiques est donc un enjeu important. En 2019, une surexpression protéique du CD90, un marqueur des cellules souches hématopoïétiques a été retrouvée dans certains sous- types de LMMJs. Celles-ci étaient associées à une expression aberrante du CD90 dans les progéniteurs, jusqu'aux cellules matures. Afin de comprendre le rôle du CD90, nous avons étudié rétrospectivement l'expression de son ARN en droplet digital PCR chez 112 patients atteints de LMMJ. Nous montrons ici une surexpression du transcrit CD90 dans les cellules mononuclées totales du sang et de la moelle, qui s'associe à d'autres facteurs de mauvais pronostic comme la surexpression de LIN28B, et à une réduction de la survie sans évènement.

Mots-clés (français) : Leucémie Myélo-Monocytaire Juvénile, CD90, LIN28B, Onco-hématologie, ddPCR, biologie moléculaire.

Title : Interest of CD90 expression in the prognosis of JMML

Abstract : Juvenile Myelo Monocytic Leukemia (JMML) is a chronic hematopathy of the child with excessive proliferation of the myelomonocyte lineage. There is significant prognostic heterogeneity between indolent forms and aggressive forms that require allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The discovery of new prognostic factors is therefore an important issue. In 2019, an overexpression of CD90, a marker of hematopoietic stem cells, was found in some subtypes of LMMJs. These were associated with an aberrant expression of CD90 in progenitors, up to mature cells. In order to understand the role of CD90, we retrospectively studied the expression of its RNA in digital droplet PCR in 112 patients with JMML. We show here that overexpression of the CD90 transcript is present in the total mononuclear cells of the blood and bone marrow, that it is associated with other poor prognostic factors such as overexpression of LIN28B, and a reduction in event free survival.

Keywords : Juvenile Myelo Monocyte Leukemia, CD90, Onco-hematology, ddPCR, molecular biology.

**Université Paris Descartes
Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'École de Médecine
75270 Paris cedex 06**