

Résumé de la thèse de Salma Hasan

Les Néoplasies Myéloprolifératives $JAK2^{V617F}$: Modélisation chez la souris knock-In, thérapie par l'Interféron α et mesure de l'architecture des clones $JAK2^{V617F}$ chez les patients

Introduction :

Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) sont des maladies malignes clonales de la cellule souche hématopoïétique (CSH) caractérisées par une prolifération excessive de cellules matures vers une ou plusieurs lignées myéloïdes spécifique à chaque type de NMP. Les NMP classiques regroupent la leucémies myéloïde chronique (LMC), la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocythémie essentielle (TE) et la myélofibrose primaire (MFP). La LMC, la PV, la TE ou la MFP sont caractérisées par des excès de production de granuleux, de globules rouges, de plaquettes ou de plaquettes et granuleux, respectivement. Cette thèse s'intéresse particulièrement au NMP classique non LMC. Ces NMPs diffèrent par leur fréquence (TE>>PV>MFP) et leur gravité (MFP>>PV>TE) avec des évolutions terminales en thromboses, myélofibroses (MF) ou leucémies aigües.

La prolifération excessive des NMP est due à une hypersensibilité aux facteurs de croissance, souvent occasionnée par des mutations de type « gain de fonction » de kinase signalisatrices ou plus rarement de type « perte de fonction » de régulateurs négatifs de cette signalisation. A l'instar de BCR/ABL pour la LMC, notre unité a identifié la mutation récurrente et activatrice du gène *JAK2* ($JAK2^{V617F}$) dans 90% des PVs et plus de 50% des TEs et des MFPs ¹. Cette découverte a conduit au développement d'inhibiteurs de JAK2 par l'industrie pharmaceutique et l'inhibiteur Ruxolitinib a été récemment le premier médicament approuvé spécifiquement pour le traitement de la MFP. Cependant, il a un effet symptomatique et non curatif.² Au contraire, l'interféron alpha peut entraîner des rémission complètes chez des patients souffrant de PV ou TE.

Objectifs de la thèse :

Le but de la thèse était de :

- 1) Développer un modèle murin performant de la maladie NMP JAK2^{V617F}
 - a) Modèle Knock-In (KI) constitutif JAK2^{V617F}
 - b) Modèle KI conditionnel JAK2^{V617F}

- 2) Utiliser le modèle KI conditionnel JAK2^{V617F} pour :
 - a) Etudier l'effet de JAK2^{V617F} sur les CSH et l'émergence des NMP
 - b) Développer l'approche préclinique : effet de l'interféron α (IFN α)

- 3) Développer une technique permettant de mesurer sur cellules sanguines le pourcentage de clones homozygotes, hétérozygote et sauvage pour la mutation JAK2^{V617F} et leur évolution au cours de traitements par l'IFN α .

Introduction de la thèse :

L'introduction comprend les chapitres suivants :

1. Hématopoïèse

- 1.1. Définition
- 1.2. Hierarchie
- 1.3. Sélection de lignée
- 1.4. Homéostasie: autorenouvellement, cycle, apoptose

2. Néoplasies myéloprolifératives (NMP)

- 2.1. Néoplasies myéloprolifératives
- 2.2. Classification
- 2.3. Etiologie
- 2.4. Les NMP classiques en dehors de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)
 - 2.4.1. Défauts moléculaires acquis
 - 2.4.1.1. Désordre clonal acquis de la cellule souche
 - 2.4.1.2. Hyper prolifération
 - 2.4.2. Principales entités
 - 2.4.2.1. Thrombocythémie Essentielle
 - 2.4.2.2. Polycythémie de Vaquez
 - 2.4.2.3. Myélofibrose Primaire

3. La mutation JAK2^{V617F}

- 3.1. La molécule JAK2
 - 3.1.1. JAK2 structure et interaction avec les récepteurs aux cytokines
 - 3.1.2. Régulation négative de la signalisation JAK2
 - 3.1.3. Activation constitutive de JAK2
 - 3.1.4. JAK2^{V617F} et signalisations en amont
 - 3.1.4.1. Signalisation JAK-STAT
 - 3.1.4.2. Signalisation PI3K/AKT
 - 3.1.4.3. Signalisation RAS/RAF/MEK/ERK

- 3.1.4.4. JAK2 nucléaire
- 3.1.4.5. JAK2 chaperonne
- 3.2. Effet de JAK2^{V617F}
 - 3.2.1. Une mutation trois phénotypes: "*a million dollar question*"
 - 3.2.1.1. Théorie du dosage génique JAK2^{V617F}
 - 3.2.1.2. Différentiel de signalisation de STAT
 - 3.2.1.3. Variation génétique de l'hôte
 - 3.2.1.4. Autres facteurs intrasèques et extrinsèques
 - 3.2.2. JAK2^{V617F} dans le compartiment des cellules souches
 - 3.2.3. L'homozygoté JAK2^{V617F}: "*double sin and the other stories*"
- 3.3. Mutation JAK2^{V617F}: "*Of Mice and MPN*"
 - 3.3.1. Modèles rétroviral
 - 3.3.2. Modèles transgéniques
 - 3.3.3. Modèles KI
- 3.4. Evènement pré-JAK2^{V617F}: "*back to square one?*"
- 3.5. Diversité clonale JAK2^{V617F}: "*Chaos is a friend of mine*"

4. Autres anomalies moléculaires des NMP – "*it's complicated!*"

- 4.1. Genes impliqués dans la signalisation intracellulaire
- 4.2. Genes impliqués dans la transformation leucémique
- 4.3. Genes impliqués dans la régulation épigénétique
- 4.4. Genes impliqués dans l'épissage des ARN pré-messagers

5. Traitements des NMP

- 5.1. Approches conventionnels:
 - 5.1.1. Thrombocythémie Essentielle
 - 5.1.2. Polycythémie de Vaquez
 - 5.1.3. Myélofibrose Primaire
- 5.2. Nouvelles approches thérapeutiques:
 - 5.2.1. Inhibiteurs de JAK2
 - 5.2.1.1. Ruxolitinib (INCB018424)
 - 5.2.1.2. SAR302503 (TG101348)

- 5.2.1.3. CYT387
- 5.2.1.4. LY2784544
- 5.2.2. Autres médicaments
 - 5.2.2.1. Pomalidomide
 - 5.2.2.2. Inhibiteur de HDAC
 - 5.2.2.3. Inhibiteur de HSP90
- 5.3. Interféron-alpha (IFN- α)
 - 5.3.1. Signalisation de l'interféron
 - 5.3.2. Mécanisme moléculaire d'action
 - 5.3.2.1. IFN- α et immunomodulation
 - 5.3.2.2. IFN- α et prolifération
 - 5.3.2.3. IFN- α et effet anti-angiogénique
 - 5.3.2.4. IFN- α et apoptose
 - 5.3.3. IFN- α dans le traitement des NMP

Résultats :

A) Modélisation chez la souris Knock-In (KI) des Néoplasies Myéloprolifératives JAK2^{V617F}, modèle préclinique de thérapie par l'Interféron α .

A la découverte de la mutation JAK2^{V617F}, nous avons développé un modèle murin rétroviral (RV) exprimant JAK2^{V617F} dans les cellules souches hématopoïétiques afin de valider la mutation comme élément déterminant dans la genèse des NMP.³ Ce modèle a démontré que la surexpression de JAK2^{V617F} génère une NMP à deux phases. :

- La première phase mime la PV avec érythrocytose, granulocytoses et hyperprolifération médullaire et splénique des lignées érythroïde, mégacaryocytaire et granuleuse.

- La deuxième phase mime la MFP avec une fibrose invalidante de la moelle et la rate qui entraîne des anémies, thrombopénies et leucocytoses sévères.

Au total, ce modèle mimait le développement de la PV avec son évolution en myélofibrose (MF) secondaire telle qu'elle est observée chez l'homme. Cependant ce modèle était imparfait. En particulier, aucune thrombocytose n'était observée contrairement aux maladies humaines JAK2^{V617F}. Par la suite, les modèles transgéniques (TG) ont montré que des thrombocytoses apparaissaient uniquement pour des niveaux faibles d'expression de JAK2^{V617F} (rapport WT/V617F ≤ 0.5).⁴ Le niveau d'expression de JAK2^{V617F} semble donc déterminant dans la diversification des maladies JAK2^{V617F} en TE ou en PV. C'est l'hypothèse dite du « dosage génique » qui pourrait expliquer que la duplication du gène muté (augmentation d'expression par homozygotie) est observée dans $\approx 90\%$ des PV mais dans seulement $\approx 5\%$ des TE. Afin de fixer le niveau d'expression de JAK2^{V617F} à un niveau physiologique dans un modèle murin, un des objectifs de la thèse était de développer une souris Knock-In (KI) JAK2^{V617F} où l'expression de JAK2^{V617F} est régulée comme chez le patient par le promoteur endogène de JAK2.

Nous avons développé une souris

(1) KI JAK2^{V617F} constitutive où JAK2^{V617F} est exprimé dans toutes les cellules de l'organisme,⁵

(2) KI JAK2^{V617F} conditionnelle où l'expression de JAK2^{V617F} peut être ciblée dans un tissu particulier, en particulier les cellules hématopoïétiques comme dans les NMP sporadiques humaines.⁶

Pour cette thèse, ce modèle nous a semblé particulièrement intéressant à utiliser pour répondre à 3 questions :

- Est-ce que JAK2^{V617F} amplifie et donne un avantage prolifératif au CSH et pourrait ainsi être responsable seul du phénotype (comme prouvé par le modèle murin RV précédent) mais aussi de l'émergence clonale et apparition de la maladie.
- Quelle nouvelle thérapie pour soigner les NMP ? en développant un modèle préclinique par l'IFN α , reporté guérir certaines PV chez l'homme par un mécanisme incompris.

a) Souris KI JAK2^{V617F} constitutive (Marty et al. Blood 2010)⁵

Nous avons développé au début de la thèse une souris KI JAK2^{V617F} constitutive. Ces souris naissent avec une fréquence mendélienne en développant une NMP similaire au modèle rétroviral, soit une phase initiale de PV et une phase terminale de MF. Une importante différence avec le modèle RV est la présence d'une thrombocytose (présente dans la plupart des PV humaines). Les souris ont aussi une durée de vie courte de 3 mois en moyenne. La femelle est stérile ; il est donc difficile de renouveler la colonie et impossible de produire des descendants homozygotes. Enfin, la maladie mime une maladie génétique germinale qui n'existe pas chez l'homme puisque JAK2^{V617F} a été décrite uniquement en tant que mutation sporadique touchant uniquement le tissu hématopoïétique. Pour toutes ces raisons, le développement d'une souris KI JAK2^{V617F} conditionnelles s'imposait.

b) Souris KI JAK2^{V617F} conditionnelles (Hasan et al. Blood 2013)⁶

La souris KI JAK2^{V617F} conditionnelle (KI JAK2^{V617F} FlexP) a été développée par la technique FLEX où la recombinaison Cre (1) excise l'exon 13 sauvage et (2) inverse l'exon 13 muté (situé à l'envers dans l'intron adjacent) provoquant ainsi sa transcription à la

place de l'exon 13 sauvage. Cette construction a été validée par croisement de la souris KI conditionnelle avec une souris TG CmvCre, d'expression ubiquitaire de Cre, qui génère un phénotype similaire au KI constitutif. La KI conditionnelle a été ensuite croisée avec des souris transgéniques vavCre ou SCLCreERt pour cibler l'expression de JAK2^{V617F} dans les cellules hématopoïétiques, comme dans la maladie humaine. Avec vavCre, JAK2^{V617F} est exprimée dès le stade fœtal et avec SCLCreERt l'expression de JAK2^{V617F} peut être induite par le tamoxifène chez l'adulte comme dans la maladie sporadique humaine. Dans ces 2 modèles nous avons montré que la souris développe à la naissance ou dès l'injection de tamoxifène une maladie de type PV suivie à 6 mois de MF secondaire. Hélas, nous n'avons pas pu produire des animaux adultes homozygotes car le KI JAK2^{V617F} FlexP est hypomorphe pour JAK2. Les fœtus homozygotes existent mais leur foie est atrophique, sans érythroblastes et progéniteurs : un phénotype identique aux animaux déficients en JAK2.

Utilisation du modèle KI JAK2^{V617F} conditionnel :

a) Effet de JAK2^{V617F} au niveau des CSH :

L'utilisation de modèle VavCre/KI JAK2^{V617F} démontre que la mutation produit non seulement une amplification des progéniteurs myéloïdes dépendant directement de JAK2^{V617F} (CFU-GM, BFU-E et CFU-E par 1,2, 3 et 15 fois, respectivement), mais aussi des progéniteurs multipotents (LSK : Lin⁻, Scal⁺ et Kit⁺ par 3,4 fois) et de type CSH (phénotype SLAM : Lin⁻, CD150⁺, CD48⁻ par 3,2 fois). Cette amplification est dépendante de l'âge des souris. A 1 mois il n'y a pas d'amplification. Par contre à 6 mois l'amplification est encore plus importante qu'à 3 mois (X7 et 6 pour les LSK et SLAM). Il en est de même des progéniteurs identifiés par FACS (MEP, GMP, CMP).

Nous avons réalisé des greffes compétitives pour évaluer l'avantage prolifératif des cellules KI. En rapport 30%KI/70%WT, les cellules granuleuses néoplasiques KI JAK2^{V617F} envahissent rapidement le sang et les compartiments médullaire et spléniques de type Lin⁻, LSK et SLAM (de 30% à > 90% à 35 semaines de greffe). Le compartiment lymphocytaire B et T se charge aussi en cellules KI JAK2^{V617F}. Ainsi ce travail montre que JAK2^{V617F} procure aux CSH un avantage prolifératif comparé aux CSH normales. Ce résultat suggère très fortement que JAK2^{V617F} pourrait être responsable de l'émergence

des NMP. Ceci est controversé dans la littérature au niveau des modèles animaux, même de nature KI.⁷ Chez l'homme, il a été aussi suggéré que JAK2^{V617F} induit une amplification tardive et que d'autres mutations touchant TET2⁸ ou DNMT3b⁹ pourraient être responsables de l'émergence clonale de ces maladies. Ces différences pourraient être dues à des différences d'espèces.

Enfinement, en dilution limite de greffes compétitives, nous avons déterminé le nombre minimale de cellules KI de type SLAM (incluant les cellules souches) de souris jeunes nécessaires à déclencher la maladie. Nous montrons que 10% de cellules KI correspondant à 17 KI SLAM déclenchent une maladie NMP à long terme dans \approx 50% de receveurs. Cela montre qu'environ 34 SLAM sont suffisantes à générer la maladie. Il est difficile de savoir si la maladie est alors clonale ou non mais ce travail démontre qu'un nombre faible de cellules souches néoplasiques sont suffisantes à déclencher la maladie dans ce modèle de greffe compétitive. Ceci renforce l'idée que la mutation seule permet le phénotype et l'apparition de la maladie sans événement moléculaire supplémentaire.

b) Effets de l'IFN α sur la maladie JAK2^{V617F}

Nous avons recherché l'intérêt préclinique de ce modèle. Nous avons ainsi choisi de tester l'effet de l'IFN α sur l'évolution de la maladie KI JAK2^{V617F}. L'IFN α est un utilisé depuis longtemps en clinique dans les NMP mais sa toxicité empêchait une correcte évaluation de sa valeur thérapeutique. Le développement d'une forme pégylée moins toxique a permis de montrer que 70% des patients PV ou TE répondaient à l'IFN α avec jusqu'à 20% de rémission moléculaire complète en traitement à long terme (3-5 ans). Nous avons tenté de reproduire ces résultats chez la souris KI. Nous avons traité par l'IFN α à 30.000 unités / jour (\approx 50 fois plus que chez l'homme) pendant 12-13 semaines des souris greffées avec des cellules médullaires normales et KI JAK2^{V617F} (rapport 30% KI / 70% WT). Nous montrons que l'IFN α corrige la leucocytose, la thrombocytose et la polyglobulie et réduit aussi la splénomégalie (jusqu'à 3 fois), avec une durée dépendante de la sévérité de la maladie initiale. De façon intéressante, l'IFN α bloque la progression des cellules JAK2^{V617F} dans le sang et les organes et à un niveau très immature (SLAM). Enfin, après 12-13 semaines de traitement, la maladie n'est pas transplantable dans des receveurs irradiés à partir des moelles des souris traitées par l'IFN α au contraire des

souris traitées par le véhicule. Ce résultat démontre que l'IFN α cible les cellules souches JAK2^{V617F} et entraîne à long terme une guérison de la maladie.

Ce résultat confirme les résultats chez l'homme et offre un modèle d'étude pour comprendre le mécanisme d'action de l'IFN α qui est largement inconnu. Il valide également ces souris KI comme un modèle préclinique permettant d'évaluer des thérapies nouvelles dans ces maladies.

En travail préliminaire, nous avons étudié si l'effet thérapeutique de l'IFN α passait par une activité de cycle ou d'apoptose sur les cellules précoces KI, deux actions importantes de ce médicament. Nous montrons d'abord que les cellules précoces KI ont une activité proliférative plus importante que les cellules équivalentes normales. Ces cellules sont aussi beaucoup moins apoptotiques que les cellules sauvages. Ces propriétés pourraient expliquer l'avantage prolifératif des cellules KI. Nous montrons que l'IFN α fait entrer en cycle les cellules normales immatures (SLAM) comme déjà publié mais ne fait pas plus entrer plus en cycle les cellules KI. Sous l'IFN α les cellules KI et WT cycle au même niveau semblant rejeter l'hypothèse d'un épuisement par l'IFN des cellules souches néoplasiques. Il semble aussi que l'IFN α induit une apoptose importante des cellules SLAM KI mais au niveau des cellules SLAM normales. Au total, l'IFN α semble donner aux cellules JAK2^{V617F} souches un caractère plus normal et moins compétitif au niveau de la division et de la survie cellulaire. Cela expliquerait en partie l'effet bénéfique de l'IFN α .

B) Architecture clonale des clones JAK2^{V617F} chez les patients (Hasan et al. Leukemia 2013) ¹⁰

Il a été démontré qu'un haplotype appelé 46/1, incluant donc une série de polymorphismes nucléotidique (SNP) dont les marqueurs rs12340895 ou rs12343867, prédispose à la mutation JAK2^{V617F}.¹¹ Cette mutation peut être homozygote suite à disomie uniparentale par recombinaison homologue sur une partie du chromosome 9 entraînant cet haplotype. Cette homozygotie, mesurée au niveau clonal dans les colonies dérivées des progéniteurs hématopoiétiques, est très fréquemment dans les PV et plus rarement trouvée dans les TE. C'est donc un critère d'évolution PV->TE de la maladie. Il est par contre difficile de savoir à partir de l'analyse des cellules sanguines la proportion de clones homozygote, hétérozygote et sauvage.

Dans ce travail, nous avons développé une méthode prédictive de la fréquence des clones hétérozygotes et homozygotes JAK2^{V617F} sur les cellules sanguines de patients, en combinant l'analyse quantitative (en PCR allèle spécifique ou mieux en Ion Torrent NGS) de l'haplotype 46/1 et de la mutation JAK2^{V617F}. Le calcul est basé sur le fait que la proportion de cellules homozygote pour rs12343867 (recombinées) est facile à connaître sur la simple mesure de la proportion de ce polymorphisme puisqu'il devrait être en théorie de 50% sans la recombinaison; la différence divisée par 2 donne donc cette proportion de recombinaison ($\%R = [(\% \text{ polymorphisme} - 50\%)/2]$). On en déduit alors directement la proportion de cellules homozygotes pour JAK2^{V617F}. Pour connaître la proportion de clone hétérozygotes il suffit d'appliquer le calcul: $\% \text{ clone JAK2}^{V617F/WT} = 2 \times (\text{proportion de cellules JAK2}^{V617F} - \% \text{ clone JAK2}^{V617F/V617F})$. Nous avons pu montrer que :

- Ce calcul prévisionnel est vérifié par l'analyse au niveau clonal sur colonies.
- La proportion de clones homozygotes ne change pas à deux niveaux de différenciation immatures (34+38+ et 34+38-) au contraire d'une augmentation du niveau immature au niveau mature (granuleux) comme déjà connu.
- Les clones homozygotes disparaissent avant les clones hétérozygotes au cours du traitement de patients répondant à l'IFN α .

Cette étude suggère donc que JAK2^{V617F} ne donne pas autant d'avantage au niveau immature qu'au niveau mature et que l'IFN- α cible préférentiellement le clone homozygote JAK2^{V617F}. Il semble donc que la réponse à l'IFN- α est fonction de l'intensité de la signalisation JAK2. Cette indication est précieuse pour rechercher le mécanisme d'action de l'IFN- α . L'IFN- α ayant une signalisation similaire à JAK2^{V617F} avec activation des voie Stat, il pourrait agir par « sursignalisation » de JAK2^{V617F} entraînant une senescence avec blocage permanent de prolifération (p21) ou apoptose par blocage de signalisation par SOCS1 ou activation de la voie P38.

Principaux articles publiés durant la thèse:

Marty C, Lacout C, Martin A, **Hasans S**, et al. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood*. 2010;116(5):783-787.

Hasan S, Lacout C, Marty C, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFNalpha. *Blood*. 2013;122(8):1464-1477.

Hasan S, Cassinat B, Droin N, et al. Use of the 46/1 haplotype to model JAK2 clonal architecture in PV patients: clonal evolution and impact of IFNalpha treatment.

Références :

1. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-1148.
2. Tefferi A. JAK inhibitors for myeloproliferative neoplasms: clarifying facts from myths. *Blood*. 2012;119(12):2721-2730.
3. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006;108(5):1652-1660.
4. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*. 2008;111(8):3931-3940.
5. Marty C, Lacout C, Martin A, et al. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood*. 2010;116(5):783-787.
6. Hasan S, Lacout C, Marty C, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFNalpha. *Blood*. 2013;122(8):1464-1477.
7. Li J, Spensberger D, Ahn JS, et al. JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. *Blood*. 2010;116(9):1528-1538.
8. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-2301.
9. Challen GA, Sun D, Jeong M, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*. 2012;44(1):23-31.
10. Hasan S, Cassinat B, Droin N, et al. Use of the 46/1 haplotype to model JAK2 clonal architecture in PV patients: clonal evolution and impact of IFNalpha treatment. *Leukemia* doi: 101038/leu2013303 [Epub ahead of print]. 2013.
11. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jager R, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41(4):450-454.