



HAL
open science

Identification et fonction de nouvelles mutations des récepteurs à la thrombopoïétine et à l'érythropoïétine dans les néoplasmes myéloprolifératifs et les érythrocytoses.

Florence Pasquier

► **To cite this version:**

Florence Pasquier. Identification et fonction de nouvelles mutations des récepteurs à la thrombopoïétine et à l'érythropoïétine dans les néoplasmes myéloprolifératifs et les érythrocytoses.. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS078 . tel-01325233

HAL Id: tel-01325233

<https://theses.hal.science/tel-01325233v1>

Submitted on 2 Jun 2016

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.

NNT : 2015SACLS078

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,

Université Paris Sud / INSERM U1170

ÉCOLE DOCTORALE N°582
Cancérologie: biologie - médecine - santé

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Florence PASQUIER

**Identification et fonction de nouvelles mutations des récepteurs à la
thrombopoïétine et à l'érythropoïétine dans les néoplasmes
myéloprolifératifs et les érythrocytoses**

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 05 novembre 2015

Composition du Jury :

Pr Turhan Ali	Professeur, CHU Kremlin-Bicêtre	Président
Pr Garçon Loïc	Professeur, CHU Amiens	Rapporteur
Pr Girodon François	Professeur, CHU Dijon	Rapporteur
Dr Verdier Frédérique	CR1, CNRS, Institut Cochin	Examinatrice
Pr Constantinescu Stefan	Professeur, Ludwig Institute, Belgique	Examinateur
Dr Plo Isabelle	CR1, INSERM U1170, Gustave Roussy	Directeur de thèse
Dr Villeval Jean-Luc	DR2, INSERM U1170, Gustave Roussy	Co-directeur de thèse
Dr Bellanné Christine	Docteur, CHU Pitié-Salpêtrière	Co-encadrant



Remerciements

Je remercie Monsieur le Professeur Ali Thuran d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie Messieurs les Professeurs Loïc Garçon et François Girodon d'avoir accepté d'être rapporteurs pour ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Stefan Constantinescu d'avoir accepté d'être examinateur lors de cette soutenance de thèse.

Je remercie Madame le Docteur Frédérique Verdier d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse mais également de son aide précieuse pour la réalisation des expériences de radioactivité à Cochin, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie tout particulièrement Isabelle Plo, ma directrice de thèse, sans qui ce travail n'aurait pu être mené à bien. Merci de ta disponibilité, de ta bonne humeur et de ton soutien pendant ces trois années. J'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble à l'avenir.

Je remercie Christine Bellanné-Chantelot, ma co-directrice de thèse, qui m'a donné la possibilité, grâce à un énorme travail préalable en génétique, de réaliser ces travaux et qui m'a appris beaucoup dans ce domaine.

Je remercie William Vainchenker pour ses précieux conseils et sa présence durant ces trois ans.

Je remercie Eric Solary pour son soutien.

Je remercie Jean-Luc Villeval d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Merci à Nicole Casadevall pour les informations cliniques et les prélèvements de patients.

Merci à Stéphane De Botton de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et de la confiance dont il me témoigne.

Pour son soutien, merci également à Vincent Ribrag.

Je remercie énormément Caroline Marty qui a été très présente tout au long de ces trois ans, qui m'a énormément appris et également beaucoup supportée (dans tous les sens du terme). C'était aussi fort agréable de pouvoir parler de nourriture de qualité avec quelqu'un qui apprécie vraiment... J'espère de tout cœur que tes projets aboutiront ! (et je suis dispo pour le barbecue...)

Je remercie toutes les personnes au sein de l'U1170, en particulier Lise (courage !!), Mira (merci pour ta gentillesse), Xénia, Abi, Rahma, Paule, Hana, Najet, le Blond, Seb, Damien, Thomas, Eric, Stefy, Alessandro, Matthieu, Allan, Daniela...

Merci à Philippe et Yann pour leur gentillesse et leur disponibilité

Je ne remercie pas les personnes qui ont décidé de m'abandonner lâchement en cours de thèse : Olive (c'est pas que tu m'aurais manqué, hein, je te rassure..) et Dom pour leur soutien, Sarah (c'était trop bien de travailler avec toi), Morgane, Aline et Carèle (parce que c'est beaucoup moins marrant sans vous toutes), Salma

Merci à mes lillois : Anne-So, Clémence, Sabine, Fanny, Caro (les filles en prem's), Jérôme, Dewi, La buche (et son baby-foot), Xavier, Omar...

Les parisiens : Le Mux, le Baps, Marido, Kam, Alec et Anaïs, Hans, Xavier, Flo, Philippe (merci, rapport au sommaire et tout ça!!)

Merci à Iléana et JB from NYC, pour leur soutien et leurs accueils répétés et toujours de qualité :)

Je souhaite dédier cette thèse à ma famille, d'abord ma mère, qui est toujours là pour me soutenir et dont l'optimisme est une aide précieuse pour la grande défaitiste que je suis, mon père qui me manque énormément, mon grand-père pour tout l'amour qu'il m'a donné et ma grand-mère.

Sommaire

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	4
RESUMES	9
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION.....	17
1. Les néoplasmes myéloprolifératifs classiques non bcr-abl.....	18
1.1. Introduction	18
1.2. Aspect cliniques et biologiques.....	18
1.2.1. La polyglobulie de Vaquez (PV)	18
1.2.2. La thrombocytémie essentielle (TE).....	19
1.2.3. La myélofibrose primitive (MFP)	19
1.3. Critères diagnostiques.....	21
1.4. Complications.....	22
1.4.1. Complications vasculaires.....	22
1.4.2. Complications hématologiques.....	23
1.5. Pronostic.....	23
1.6. Traitement.....	24
1.6.1. TE et PV.....	24
1.6.2. MFP.....	25
1.7. Aspects moléculaires.....	26
1.7.1. Altération de la voie JAK-STAT.....	26
1.7.1.1. <i>La famille des Janus kinase (JAK)</i>	26
1.7.1.2. <i>JAK2 et signalisation</i>	28
1.7.1.3. <i>JAK2V617F</i>	31
1.7.1.4. Mutations dans l'exon 12 de JAK2	33
1.7.1.5. Mutations de <i>MPL</i>	34
1.7.1.6. Mutations de <i>CALR</i>	35
1.7.1.7. Mutations de régulateurs négatifs de la voie des JAK.....	36
1.7.2. Mutations de facteurs d'épissage et de régulateurs de l'épigénétique	37
1.7.2.1. Mutations de régulateurs de l'épissage.....	37
1.7.2.2. Mutation des régulateurs de l'épigénétique	37
1.7.2.2.1. Mutations de TET2	38
1.7.2.2.2. Mutations d'IDH1/2	38

1.7.2.2.3. Mutations de DNMT3A.....	38
1.7.2.2.4. Mutation d'ASXL1.....	39
1.7.3. Autres mutations associées à la transformation en LAM secondaires.....	40
<u>Article 1</u> : Myeloproliferative Neoplasms: JAK2 Signaling Pathway as a Central Target for Therapy	41
2. Complexité génétique des NMP et prédisposition génétique.....	42
2.1. Complexité génétique des NMP et prédisposition aux NMP dans la population générale	42
2.2. Les NMP familiaux.....	44
2.2.1. Aspects génétiques.....	44
2.2.2. Description.....	44
2.2.3. Prédisposition aux NMP familiaux.....	45
3. EPOR et érythrocytose.....	48
3.1. L'érythropoïèse	48
3.1.1. Description.....	48
3.1.1.1. Stades précoces de l'érythropoïèse.....	48
3.1.1.2. Stades tardifs de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse.....	49
3.1.1.3. Stades tardifs de l'érythropoïèse dans le sang périphérique	50
3.1.2. Régulation de l'érythropoïèse par les besoins en O ₂	51
3.2. Le récepteur à l'érythropoïétine (EPOR).....	53
3.2.1. Expression d'EPOR	53
3.2.2. Structure	54
3.2.3. Maturation d'EPOR.....	55
3.2.4. Fonctions d'EPOR dans l'érythropoïèse et voies de signalisation.....	55
3.2.5. Régulation négative d'EPOR.....	57
3.2.5.1. Rétrocontrôle négatif de la signalisation.....	57
3.2.5.2. Internalisation et dégradation d'EPOR.....	58
3.3. Erythrocytoses familiales et mutations d'EPOR.....	60
4. Objectifs du travail.....	69
RESULTATS.....	70
Résultats 1 : Erythrocytose congénitale et mutations d'EPOR : étude d'EPOR c.1300dupC (p.Gln434Profs*11)	71
Contexte et objectifs du travail.....	72
Résultats.....	73
Conclusion et perspectives	74
<u>Article 2</u> : Truncated erythropoietin receptor does not explain by itself the development of erythrocytosis.....	77
Résultats 2 : Prédisposition aux NMP : étude d'EPOR p.Pro488Ser	78

Contexte et objectifs du travail.....	79
Matériels et méthodes.....	80
Lignées cellulaires.....	80
Cytokines.....	80
Plasmides et constructions	80
Etude de la viabilité cellulaire.....	81
Signalisation induite par EPOR : dose réponse à l'EPO.....	81
Etude de la dégradation d'EPOR : essai à la cycloheximide.....	81
Etude de l'expression de HA-EPOR à la surface cellulaire.....	81
Etude de l'internalisation d'EPOR.....	82
Patients et purification des cellules primaires.....	82
Cultures clonogéniques des progéniteurs en milieu semi-solide.....	82
Signalisation de MPL : dose réponse à la TPO	82
Génotypage des colonies.....	83
Résultats.....	83
1. Description de la famille.....	83
2. Etude d'EPOR P488S dans la lignée cellulaire Ba/F3	86
Etude de la réponse à l'EPO (test de viabilité au WST-1)	86
Etude de la signalisation d'EPOR en réponse à l'EPO	86
Etude de l'expression à la membrane d'EPOR WT et EPOR P488S	86
Etude de la stabilité d'EPOR WT et EPOR P488S.....	87
Etude de l'internalisation d'EPOR WT et EPOR P488S	87
3. Cellules primaires.....	89
Etude de la réponse à l'EPO et la TPO dans les cellules primaires.....	89
Etude de la signalisation dans les plaquettes en réponse à la TPO	89
Génotypage <i>JAK2V617F</i> dans les colonies érythroïdes.....	89
Discussion et perspectives.....	91
Résultats 3 : Mutations rares de MPL dans les TE triples négatives	94
Contexte et objectifs du travail.....	95
Résultats.....	96
Discussion et perspectives.....	97
<u>Article 3</u> : Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple negative Essential Thrombocythemia Patients	100
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	101
1. Erythrocytoses	102
1.1. Erythrocytose et PV : diagnostic différentiel	102
1.2. Mutations germinales d'EPOR dans les érythrocytoses primitives	102
2. Mécanismes de prédisposition aux NMP familiaux	105

2.1. Les prédispositions aux NMP familiaux n'induisent pas de phénotype mais favorisent leur développement.....	105
2.2. Diversité et complexité des prédispositions aux NMP familiaux.....	106
2.2.1. Diversités clinique et biologique des NMP familiaux	106
2.2.2. Diversité des <i>loci</i> et des mécanismes de prédisposition aux NMP familiaux.....	107
2.3. Conclusion.....	108
3. Mutations de signalisation et développement des NMP	109
3.1. NMP triples négatifs et mutations rares de MPL.....	109
3.2. Mécanismes de développement des NMP	110
LISTE DES PUBLICATIONS	113
LISTE DES COMMUNICATIONS.....	115
ANNEXES	117
<u>Annexe 1</u> : Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution.....	118
<u>Annexe 2</u> : Germline duplication of <i>ATG2B</i> and <i>GSKIP</i> predisposes to familial myeloid malignancies..	119
BIBLIOGRAPHIE	120

Résumés

Titre : Identification et fonction de nouvelles mutations des récepteurs à la thrombopoïétine et à l'érythropoïétine dans les néoplasmes myéloprolifératifs et les érythrocytoses.

Mots clés : néoplasmes myéloprolifératifs, érythrocytose, récepteurs à cytokines, prédisposition

Résumé : Le récepteur à l'érythropoïétine (EPOR) peut être muté dans les érythrocytoses congénitales tandis que des mutations de MPL, récepteur à la thrombopoïétine, sont observées dans certains néoplasmes myéloprolifératifs (NMP). L'érythrocytose congénitale touche exclusivement les progéniteurs érythroïdes et se traduit par une polyglobulie isolée. Des mutations d'EPOR sont décrites dans environ 12% des cas. La première partie de cette thèse reposait sur l'étude fonctionnelle d'une mutation d'EPOR, jamais décrite, c.1300dupC (p.Gln434Profs*11). Ce mutant est responsable, dans les cellules primaires et les lignées cellulaires, d'une hypersensibilité majeure à l'EPO qui n'est pas due à la perte de sites de régulation négative du signal ou à un défaut d'internalisation du récepteur, contrairement aux données de la littérature, mais à une stabilisation d'EPOR à la membrane cellulaire par probable changement conformationnel. Dans la seconde partie, un variant d'EPOR Pro488Ser a été étudié au sein d'une famille de NMP. Seule une activation spontanée faible de STAT5 a pu être mise en évidence dans les lignées cellulaires. Des modèles murins et/ou d'iPSC seront développés dans l'hypothèse d'une coopération entre EPOR P488S et JAK2V617F. Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous avons réalisé une étude fonctionnelle de 2 mutations rares de MPL, Tyr591Asn et Ser204Pro, identifiées chez 3 patients TE triples négatifs. Seul un gain de fonction faible a été mis en évidence, suggérant que ces mutations doivent être associées à d'autres anomalies génétiques pour entraîner l'apparition d'un phénotype.

Title: Identification and role of thrombopoietin and erythropoietin receptors mutations in myeloproliferative neoplasms and erythrocytosis

- **Keywords:** myeloproliferative neoplasms, erythrocytosis, cytokine receptors, predisposition

Abstract: EPOR mutations are observed in Primary familial and congenital polycythaemia (PFCP) while MPL mutations are found in myeloproliferative neoplasms (MPN). PFCP is an inherited disorder of erythroid progenitor cells resulting in elevated erythrocyte mass. Several mutations of the erythropoietin receptor (EPOR) gene have been associated with PFCP. They are all leading to a premature STOP codon and the truncation of the cytoplasmic COOH-terminal of EPOR. To examine the role of EPOR mutations in the pathogenesis of PFCP, we studied a new EPOR mutation, c.1300dupC (p.Gln434Profs*11). This mutation induced, in primary cells and cell lines, a major hypersensitivity to EPO. This phenotype was not due to the loss of negative regulation domains or an internalisation default, contrary to the current hypothesis, but rather due to conformational modification inducing the stabilisation of the mutant at the cell membrane. In the second part of this work, an EPOR mutation, Pro488Ser, was studied in a myeloproliferative neoplasms (MPN) family. Only a mild spontaneous STAT5 activation was observed in cell lines. Murine models and/or iPSC will be developed in order to test the hypothesis of cooperation between EPOR P488S and JAK2 V617F. In the last part of this project, 2 rare MPL mutants, Tyr591Asn and Ser204Pro, identified in 3 triple negative ET patients were functionally studied. A weak gain of function was observed, suggesting that these mutants have to be associated to other genetic abnormalities to develop a phenotype.

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Superfamille des récepteurs à cytokines et JAK associés.	27
Figure 2 : Activation physiologique des récepteurs à cytokines homodimériques.....	31
Figure 3 : Mutation JAK2 V617F.	33
Figure 5 : Erythropoïèse	51
Figure 6 : Régulation de la synthèse d'EPO par la pO2.	53
Figure 7 : Modèle d'internalisation et de dégradation d'EPOR après stimulation par l'EPO.	60
Figure 8 : Mutations tronquantes d'EPOR décrites dans les EFP	65
Figure 9 : Prédispositions génétiques aux NMP et aux « NMP-like », selon de leur pénétrance et leur fréquence dans la population générale.	68
Figure 10 : Arbre généalogique de la famille.	84
Figure 11 : Etude fonctionnelle d'EPOR P488S dans les lignées cellulaires.	87
Figure 12 : Etude des cellules primaires.....	90
Tableau 1 : Critères diagnostiques OMS 2008 pour les NMP.	21
Tableau 2 : Mutations entrainant une troncation d'EPOR décrites dans les EFP	64
Tableau 3 : Mutations substitutions d'EPOR décrites dans les EFP	65
Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et biologiques des membres de la famille.....	85

Liste des abréviations

2-HG : 2-hydroxyglutarate

AA : acides aminés

Ac : anticorps

AD : autosomique dominante

ALAS2 : aminolevulinic acid synthase 2

ARSI-T : anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose

ASXL1 : additional sex comb-like1

ATG2B : autophagy related 2B

BAD : bcl-associated death

bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large

BFU-E : Burst Forming Unit-Erythroid

BPGM : 2,3-bisphosphoglycerate mutase

BOM : biopsie ostéo-médullaire

BTG1 : B cell translocation gene 1

βTrcp : beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase

CALR : calréticuline

CBL : Casitas B-lineage lymphoma

CIS : cytokine-inducible SH2-containing protein

CFU-E : colony forming unit-erythrocyte

CFU-EM : colony forming unit-erythrocyte /megacaryocyte

CFU-GEMM : colony forming unit-granulocyte/érythrocyte/mégacaryocyte/macrophage

CFU-GM : colony forming unit-granulocyte/macrophage

CFU-MK : colony forming unit-megacaryocyte

CHX: cycloheximide

CNV : copy number variation

COMFORT : Controlled Myelofibrosis Study with Oral JAK Inhibitor Treatment

CSF3R : colony stimulating factor 3 receptor

CSH : cellule souche hématopoïétique

DGVS : database of genomic variants

DIPPS : dynamic international prognostic scoring system

DNMT3A : DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A

EBV : Epstein-Barr virus

ECLAP : European collaboration on low-dose aspirin in polycythemia vera

EEC : colonies érythroïdes endogènes

EF(P) :érythrocytoses familiales (primitives)

EGF : epidermal growth factor

EKLF : erythroid Krüppel-like factor

EPO : érythropoïétine

EPO-I125 : EPO marquée à l'iode 125

EPOR : récepteur à l'érythropoïétine

ERK : extracellular ligand-regulated kinase

ETV6 : ets variant 6

EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2

FAS : Fas-ligand

FERM : Band-4.1, ezrin, radixin, and moesin

Fli1 : Friend leukemia integration 1

FOG : friend of GATA

FOXO3A : forkhead transcription factor 3A

FPD/AML : familial plate disorders/acute myeloid leukemia

FT : facteur de transcription

Gab : growth factor-bound protein (Grb)-associated binder
GATA1 : GATA binding protein 1
G-CSF : Granulocytes-colony stimulating factor
GH : growth hormone
GRB2 : growth factor receptor-bound protein 2
GM-CSF : granulocyte monocyte-colony stimulating factor
GSK3 : Glycogen synthase kinase-3
GSKIP : GSK3B interacting protein

Hb : hémoglobine
HDAC : Histone désacétylases
HELZ : helicase with zinc finger
HIF2 α : hypoxia-inducible factor 2 α
HRE : hypoxia-resopnsive element
HSP : Heat Shock protein
HU : hydroxy-urée

IDH : isocitrate déshdrogénase
IFN α : interféron alpha
IKZF1 : IKAROS family zinc finger 1
IL : interleukine
IPSET : international prognostic score of thrombosis for ET
iPSC : induced pluripotent stem cell
IPSS : international scoring system
IRS2 : insulin receptor substrate-2

JAK2 : Janus kinase 2
JH : JAK homology
JNK : c-Jun N-terminal kinases

KI : knock-in
KIR : kinase inhibitory region
KLF1 : Krüppel-like factor 1
KO : knock-out

LAM : leucémie aiguë myéloïde
LMC : leucémie myéloïde chronique
LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique

MAPK : mitogen-activated protein kinase
MS : mastocytose systémique
MEK : MAPK/ERK Kinase
MK : mégacaryocytes
MF : myélofibrose
MFP : myélofibrose primitive
MPL : myeloproliferative leukemia protein
mTOR : mammalian target of rapamycin

NMP : néoplasme myéloprolifératif

OMS : organisation mondiale de la santé

P70S6K : 70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1
P90rsk : 90 kDa ribosomal protein S6 kinase 1
PFCP : primitive familial and congenital polycythemia
PHD : prolyl hydroxylase domain

PI3K : phosphoinositol triphosphate kinase
PIAS : protein inhibitors of activated STATs family
PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PNN : polynucléaires neutrophiles
p-Tyr : tyrosine phosphorylée
PV : maladie ou polyglobulie de Vaquez

RE : réticulum endoplasmique
RHD : runt homology domain
rtQTL : replication timing quantitative trait loci
RUNX1 : runt-related transcription factor 1

SAPK : Stress-activated protein kinases
SCF : Stem Cell Factor
SF3B1 : splicing factor 3b subunit 1
SH2 : Src homology 2
SHIP : SH2-containing inositol-5 phosphate
Skp2 : S-phase kinase-associated protein 2
SMD : syndrome myélodysplasique
SNP : single-nucleotide polymorphism
SOCS : supressor of cytokine signaling proteins
SRSF2 : Serine/arginine-rich splicing factor 2
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

TE : thrombocytémie essentielle
TET : tet méthylcytosine dioxygénase
TERT : télomérase reverse transcriptase
TPO: thrombopoïétine
TYK2 : tyrosine kinase 2

VHL : von Hippel-Lindau

WES : whole exome sequencing

Introduction

1. LES NEOPLASMES MYELOPROLIFERATIFS CLASSIQUES NON BCR-ABL

1.1. Introduction

Les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) sont des hémopathies clonales rares touchant la cellule souche hématopoïétique (CSH) [1]. Ils sont caractérisés par une production excessive de cellules myéloïdes matures, due à une hypersensibilité ou une indépendance aux cytokines, sans blocage de maturation. Ils ont été regroupés pour la première fois au sein d'une même entité clinico-biologique, les désordres myéloprolifératifs, par Dameshek en 1951 [2]. Le terme de « néoplasmes myéloprolifératifs » est utilisé depuis la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2008 [3]. Les NMP classiques non BCR-ABL regroupent la maladie ou polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocythémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP). Ces pathologies touchent les différentes lignées myéloïdes mais impliquent plus particulièrement la lignée érythroïde pour la PV, la lignée mégacaryocytaire pour la TE et les lignées mégacaryocytaire et granuleuse pour la MFP. Malgré des présentations clinico-biologiques et des pronostics différents, ces pathologies sont caractérisées par un spectre commun d'anomalies moléculaires acquises, avec la présence, à fréquence variable, de mutations de *JAK2* (Janus kinase 2), de *MPL* (myeloproliferative leukemia protein) et de *CALR* (calréticuline). Les complications vasculaires et hématologiques sont également communes à ces trois pathologies.

1.2. Aspect cliniques et biologiques

1.2.1. La polyglobulie de Vaquez (PV)

L'âge moyen au diagnostic est de 60 ans [4] et l'incidence annuelle de cette pathologie est d'environ 2 cas pour 100 000 habitants.

La PV touche essentiellement la lignée érythroïde et est caractérisée par l'existence d'une polyglobulie vraie, définie par une augmentation du volume globulaire > 125%. Les patients sont le plus souvent asymptomatiques au diagnostic. L'examen clinique retrouve dans 75% des cas une splénomégalie, généralement modérée, parfois associée à une hépatomégalie. Une érythrose cutanée ou un prurit à l'eau, rare mais évocateur, sont parfois retrouvés. Lorsque la polyglobulie est sévère, un syndrome d'hyperviscosité, traduisant le ralentissement du flux sanguin par l'augmentation de la viscosité sanguine, peut être

observé, associant céphalées, vertiges, troubles neurosensoriels (acouphènes, flou visuel..) et paresthésies. A terme, le risque est la constitution d'un déficit neurologique central mimant un accident vasculaire cérébral ischémique. L'existence d'un syndrome d'hyperviscosité clinique est une indication à la réalisation de saignées en urgence.

Biologiquement, la polyglobulie se traduit sur l'hémogramme par une élévation du taux d'hémoglobine (Hb) au delà de 18,5 g/dl chez l'homme et 16,5 g/dl chez la femme, ainsi que du taux d'hématocrite (> 54% chez l'homme et >47% chez la femme). Dans environ 50% des cas, une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles (PNN) et une thrombocytose modérées y sont associées. Le taux d'érythropoïétine (EPO) circulant est normal ou bas. 95% des patients présentent une mutation *JAK2V617F* et 2% à 3% une mutation dans l'exon 12 de *JAK2*.

1.2.2. La thrombocytémie essentielle (TE)

L'âge moyen au diagnostic est de 55-60 ans [5] et l'incidence annuelle de cette pathologie est de 2,5 cas pour 100 000 habitants.

La TE touche principalement la lignée mégacaryocytaire et se traduit par une thrombocytose chronique à l'hémogramme, définie par un taux de plaquettes > 450 G/l, observée de manière répétée.

Les patients sont généralement asymptomatiques au diagnostic. L'examen clinique retrouve une splénomégalie dans environ un tiers des cas.

60% des patients présentent une mutation *JAK2V617F*, 5% une mutation *MPLW515A/K/L* et 15% à 25% une mutation de *CALR*. 10 à 20% des patients ne présentent donc aucune de ces anomalies moléculaires et sont dits triples négatifs.

La TE demeure un diagnostic d'élimination et les autres causes de thrombocytose doivent être écartées, qu'elles soient réactionnelles (à une carence martiale, une inflammation, un contexte post-chirurgical), secondaires à un autre NMP ou à certains syndromes myélodysplasiques (SMD) type syndrome 5q- ou encore d'origine familiale. La biopsie ostéo-médullaire (BOM) est recommandée au diagnostic afin d'éliminer une « PV masquée » ou une MFP au stade pré-fibrotique, dont le pronostic est sensiblement moins bon [6] {Tefferi, 2014 #129} [7].

1.2.3. La myélofibrose primitive (MFP)

L'âge moyen au diagnostic est de 64 ans et l'incidence annuelle de cette pathologie est de 1 cas pour 100 000 habitants.

La physiopathologie de la MFP est mal connue. Les cellules du clone (CD34⁺, mégacaryocytes (MK), monocytes) sont responsables d'une hyperproduction de cytokines, causant une activation des cellules stromales médullaires, non clonales. Il en résulte une production exagérée de cytokines pro-inflammatoires, pro-angiogéniques et pro-fibrotiques, ainsi que de composants de la matrice extracellulaire, aboutissant à la formation d'une fibrose médullaire et d'une hématopoïèse extra-médullaire, essentiellement dans la rate, par migration des progéniteurs hématopoïétiques.

Les patients sont rarement asymptomatiques et présentent fréquemment des signes généraux tels que de la fièvre, des sueurs nocturnes, une cachexie, des douleurs osseuses, responsables d'une altération parfois majeure de leur qualité de vie. L'examen clinique retrouve une splénomégalie dans 90% des cas, qui peut être majeure. Elle peut être responsable d'un hypersplénisme qui, associé à la fibrose médullaire, entraîne l'apparition de cytopénies se traduisant par un syndrome anémique (asthénie, dyspnée, pâleur cutanéomuqueuse), hémorragique et/ou infectieux (hyperthermie). Associée à une hépatomégalie (50% des patients), la splénomégalie peut se compliquer d'une hypertension portale qui peut entraîner l'apparition d'ascite et de varices oesophagiennes avec risque d'hémorragie digestive. Enfin, les splénomégalies les plus volumineuses peuvent causer des douleurs, une anorexie et une dyspnée.

L'hémogramme peut retrouver une anémie normochrome normocytaire arégénérative, des taux de leucocytes et de plaquettes variables, 5 à 15% de myélémie, 1 à 3% de blastes et 2 à 20% d'érythroblastes circulants. L'analyse du frottis sanguin met généralement en évidence la présence de dacryocytes, témoignant de la myélofibrose, ainsi que des anomalies de la lignée mégacaryocytaire, tels que des micromégacaryocytes, des noyaux nus de MK ou des macrothrombocytes souvent dégranulés. La BOM, indispensable au diagnostic, retrouve une hyperplasie et une dystrophie des MK regroupés en clusters, ainsi qu'un degré variable de fibrose. Le caryotype médullaire, difficilement réalisable à cause la fibrose, peut mettre en évidence une trisomie 8, une monosomie 5 ou 7, un réarrangement en 11q23, une délétion 20q. La mutation *JAK2V617F* est retrouvée dans environ 60% des cas, les mutations *MPLW515A/K/L* dans 5 à 10% des cas et les mutations de *CALR* dans 15% à 25% des cas. Comme pour les TE, environ 10% à 20% des patients ne présentent aucune de ces mutations et sont dits triples négatifs. Des mutations de régulateurs de l'épigénétique, tels que *TET2* (tet méthylcytosine dioxygénase), *ASXL1* (additional sex comb-like1), *DNMT3A* (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A) ou *IDH* isocitrate déshydrogénase), et de facteurs d'épissage, non recherchés en routine, sont fréquemment retrouvés, contrairement aux PV ou TE.

1.3. Critères diagnostiques

La classification OMS 2008 est actuellement en cours (Tableau 1). Une révision de cette classification a été proposée en 2014 [8]. Pour le diagnostic de PV, les taux d'hémoglobine et d'hématocrite seuil sont abaissés et la réalisation d'une BOM au diagnostic est fortement recommandée afin de ne pas méconnaître une PV masquée ou une TE avec un taux d'hémoglobine élevé [9]. La pousse autonome des progéniteurs érythroïdes, méthode obsolète et réalisée dans de rares laboratoires, est supprimée de la liste des critères diagnostiques. D'autre part, les mutations *MPLW515A/K/L* et de *CALR*, découvertes en 2013, sont intégrées de façon manifeste dans les critères diagnostiques majeurs des TE et MFP.

Tableau 1 : Critères diagnostiques OMS 2008 pour les NMP.

Le diagnostic de polyglobulie de Vaquez nécessite la présence des deux critères majeurs et d'un critère mineur ou du premier critère majeur et de deux critères mineurs. Le diagnostic de thrombocytémie essentielle nécessite la présence des 4 critères majeurs. Le diagnostic de myélofibrose primitive nécessite la présence des 3 critères majeurs et de 2 critères mineurs. Abréviations: BOM: biopsie ostéo-médullaire; EPO: érythropoïétine; NMP: néoplasmes myéloprolifératifs; SMD: syndromes myélodysplasiques; MK: mégacaryocytes; MFP: myélofibrose primitive, LDH: lactates déshydrogénase

	Polyglobulie de Vaquez	Thrombocytémie essentielle	Myélofibrose primitive
<i>Critères majeurs</i>	1- Hb > 18,5g/dl (homme) / 16,5 g/dl (femme) ou augmentation de l'hématocrite ou augmentation du volume globulaire	1- Plaquettes > 450 G/l	1- BOM : hyperplasie et atypie des MK et/ou fibrose ou aspect de MFP au stade pré-fibrotique
	2- Présence d'une mutation de <i>JAK2</i> (V617F ou exon 12)	2- BOM: hyperplasie de MK matures non dystrophiques	2- Pas de critères pour autre pathologie myéloïde (SMP, SMD)
		3- Pas de critères pour autre pathologie myéloïde (NMP, SMD)	3- Présence d'un marqueur de clonalité ou pas d'argument pour une fibrose réactionnelle
		4- Présence d'un marqueur de clonalité ou pas d'arguments pour une thrombocytose secondaire	
<i>Critères mineurs</i>	1- BOM : Hyperplasie des 3 lignées myéloïdes		1- Erythroblastes circulants
	2- EPO sérique normale ou diminuée		2- LDH augmentées
	3- Pousse autonome des progéniteurs		3- Anémie
			4- Splénomégalie palpable

1.4. Complications

1.4.1. Complications vasculaires

Il s'agit des complications les plus fréquemment observées chez les patients atteints de PV et TE. Facteur principal de morbidité et mortalité dans ces pathologies, leur prévention est un des objectifs principaux de la prise en charge thérapeutique.

Dans les cas de PV, les complications thrombotiques sont souvent inaugurales ou ont lieu lorsque la maladie est mal contrôlée (hématocrite > 65%). L'existence d'un syndrome de Budd-Chiari doit faire systématiquement rechercher une PV non diagnostiquée. L'étude ECLAP (European collaboration on low-dose aspirin in polycythemia vera) retrouvait une incidence annuelle cumulée d'événements cardio-vasculaires d'environ 5,5 cas pour 100 patients et les thromboses étaient la principale cause de mortalité [10]. Les facteurs de risque thrombotique pour les sujets atteints de PV sont les antécédents de thrombose, un âge supérieur à 65 ans pour les thromboses veineuses [11] [10] et l'existence d'une hypertension artérielle pour les thromboses artérielles [11]

Les sujets atteints de TE peuvent présenter aussi bien des complications thrombotiques, essentiellement artérielles et de la microcirculation (érythromélagies), qu'hémorragiques, notamment lorsque le taux de plaquettes excède 1 500 G/l. Les facteurs de risque de thromboses artérielles dans les TE sont un âge supérieur à 60 ans, l'existence d'antécédents de thrombose, la présence de facteurs de risque cardio-vasculaire non équilibrés et la présence d'une mutation *JAK2V617F*, ainsi que le sexe masculin pour les thromboses veineuses [12]. Les patients atteints de TE avec mutation de *CALR* ont un risque thrombotique moins élevé que ceux mutés *JAK2V617F* [13] [14]. Le score IPSET (International Prognostic Score of Thrombosis for ET), qui prend en compte l'âge supérieur à 60 ans (1 point), les antécédents de thrombose (2 points), les facteurs de risque cardio-vasculaire (1 point) et la présence de la mutation *JAK2V617F* (2 points), permet d'identifier les patients à faible risque (< 2 points), à risque intermédiaire (2 points) ou à haut risque (> 2 points) de complications thrombotiques [15] [16].

1.4.2. Complications hématologiques

Les complications hématologiques sont tardives, survenant généralement après 8 à 10 ans d'évolution, qu'il s'agisse d'une transformation en PV pour les TE, en myélofibrose (MF) pour les TE et les PV, ou en leucémie aiguë myéloïde (LAM) pour les TE, PV et PMF.

Pour les PV, le risque de transformation en MF est d'environ 10% à 10 ans et en LAM de 5% à 10 ans et 10% à 20 ans [17]. Les facteurs de risque de transformation en LAM retrouvés dans différentes études sont l'âge avancé [18], la leucocytose au diagnostic, la présence d'anomalie(s) au caryotype et un antécédent de traitement par phosphore 32 ou alkylants [4] [18].

Le risque de transformation en LAM est d'environ 5% à 20 ans pour les TE, le risque de transformation en MF étant supérieur (10-20% à 10 ans) [5]. Les facteurs de risque d'acutisation pour les TE sont le stade pré-fibrotique, les antécédents de thrombose, l'anémie (Hb < 12g/dl) et une thrombocytose > 1 000G/L [5].

Le risque global d'acutisation des MFP est de 20%.

1.5. Pronostic

Une diminution de l'espérance de vie est observée dans tous les NMP [19].

La survie médiane pour les sujets atteints de PV est de 14 ans (24 ans pour les plus jeunes). Les facteurs l'influençant sont l'âge avancé, l'hyperleucocytose et les antécédents de thrombose [4, 20], ainsi que la présence d'anomalie(s) au caryotype [4].

Bien que la survie médiane des patients atteints de TE soit meilleure que pour les autres NMP (20 ans en moyenne, 30 ans chez les plus jeunes), leur espérance de vie demeure moindre que celle de la population générale [21] [22]. L'âge supérieur à 60 ans, les antécédents de thrombose et l'hyperleucocytose (> 11 G/L) [5, 22] influencent négativement la survie de ces patients, contrairement au statut mutationnel *JAK2* ou *CALR* qui n'a pas d'impact pronostique [23].

La survie médiane est de 6 ans pour les patients atteints de MFP (15 ans pour les plus jeunes) [22]. Il s'agit cependant d'une pathologie hétérogène et divers scores pronostiques permettant d'identifier des patients de même risque et d'adapter leur prise en charge thérapeutique ont été développés : l'IPSS (international scoring system) [24] puis le DIPPS (dynamic international prognostic scoring system) [25] et enfin le DIPPS-plus. Ce dernier prend en compte 8 facteurs: un âge supérieur à 65 ans, un taux d'Hb < 10 g/dl, une hyperleucocytose > 20 G/L, la présence de plus de 1% de blastes circulants, la présence de signes généraux, des anomalies de mauvais pronostic au caryotype, une dépendance transfusionnelle et un taux de plaquettes < 100 G/L. Il permet d'identifier les sujets à bas

risque (aucun facteur de mauvais pronostic), à risque intermédiaire 1 (1 facteur de mauvais pronostic), à risque intermédiaire 2 (2 ou 3 facteurs de mauvais pronostic) et à haut risque (\geq 4 facteurs de mauvais pronostic), avec des survies médianes respectives de 15.4, 6.5, 2.9 et 1.3 ans [26]. Récemment, de nouveaux scores pronostiques, le MIPPS (Mutation-enhanced International Prognostic Scoring System) [27] et le GPSS (Genetic-based Prognostic Scoring System) [28] (ont été développés, afin d'associer aux facteurs cliniques, hématologiques et cytogénétiques, des critères moléculaires, notamment le statut mutationnel pour *CALR* et *ASXL1*). Leur évaluation est actuellement en cours, cependant le MIPPS permet de discriminer différents groupes de risque dont la survie est de moins de deux ans pour les patients à haut risque, à plus de 25 ans pour les sujets dits de faible risque. Il s'agit donc d'une pathologie hétérogène en terme de survie et une évaluation pronostique individuelle est cruciale, afin, notamment, de poser une éventuelle indication d'allogreffe de CSH.

1.6. Traitement

1.6.1. TE et PV

La survie des sujets atteints de PV et de TE est relativement longue et les principales causes de morbidité et de mortalité sont représentées par les complications thromboemboliques. Leur prévention est donc l'objectif principal de la prise en charge thérapeutique de ces patients.

Plusieurs études ont montré une diminution de ce risque grâce à l'administration d'antiagrégants plaquettaires pour les PV [10] [29] et les TE de haut risque [30]. Elle permet également de diminuer la symptomatologie micro-vasculaire (érythromélgies, céphalées) dans les TE. Lorsque le taux de plaquettes est supérieur à 1000 – 1500 G/L, l'administration de l'antiagrégant plaquettaire doit être différée en raison du risque de maladie de Willebrand acquise, responsable de complications hémorragiques [31] [32].

Le contrôle des facteurs de risque cardio-vasculaire (hypertension artérielle, dyslipidémie, diabète, obésité, tabagisme, sédentarité) doit être drastique chez tous les patients.

Pour les sujets atteints de PV, un taux d'hématocrite cible de moins de 45% [33] doit être de plus obtenu par la réalisation de saignées itératives. Celles-ci permettent une diminution rapide du taux d'hématocrite et doivent être débutées en urgence en cas de syndrome d'hyperviscosité.

Pour les sujets à haut risque de complications thromboemboliques (> 60 ans et/ou antécédents de thrombose), un traitement myélofreinateur doit être associé. La molécule de choix en première ligne demeure l'hydroxy-urée (HU, Hydréa®) en raison de son efficacité et de son innocuité à long terme, aucune étude n'ayant mis en évidence d'augmentation du

risque de transformation dû à son utilisation [34] [21]. En cas d'intolérance ou d'inefficacité, le traitement de seconde ligne est l'interféron alpha (IFN α) pégylé pour les sujets les plus jeunes [35] [36] et le busulfan [37] pour les sujets les plus âgés. L'anagrélide est une alternative pour les sujets atteints de TE mais cette molécule pourrait être responsable d'une augmentation du risque de transformation en MF ainsi que de thromboses artérielles et d'accidents hémorragiques [38], bien que ces dernières données soient discutées dans la littérature [39]. Enfin, en cas de grossesse, un traitement antiagrégant plaquettaire doit être administré, associé à l'IFN α pour les femmes à haut risque de thrombose [40].

L'utilisation d'un inhibiteur de JAK2, le ruxolitinib (Jakavi®), dans l'essai de phase 3 RESPONSE (Randomized Study of Efficacy and Safety in Polycythemia Vera with JAK Inhibitor INCB018424 versus Best Supportive Care) a permis, chez des patients atteints de PV résistants ou intolérants à l'HU, d'obtenir une diminution de la splénomégalie dans 40% des cas et une normalisation du taux d'hématocrite dans 60% des cas [41]. Suite à ses résultats, l'utilisation du ruxolitinib dans cette indication a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA).

1.6.2. MFP

Au même titre que dans les TE et PV, les complications thromboemboliques et hémorragiques doivent être prévenues.

La prise en charge thérapeutique doit être adaptée au risque individuel de chaque patient, allant de l'abstention thérapeutique pour les sujets asymptomatiques de bas risque ou intermédiaire 1, à l'allogreffe de CSH, qui demeure le seul traitement curatif, pour les sujets de pronostic péjoratif. Le nombre de patients éligibles demeure cependant faible en raison de la toxicité importante de ce procédé, avec 25% de mortalité et de morbidité sévère. Les autres moyens thérapeutiques (traitements immunomodulateurs, HU, corticothérapie, EPO recombinante) demeurent uniquement symptomatiques avec des taux d'efficacité avoisinant les 20% [42]. Le support transfusionnel doit être limité autant que possible, notamment en cas de projet d'allogreffe.

La gravité de cette pathologie, l'absence d'alternative thérapeutique curative à l'allogreffe ainsi que le parallèle avec les inhibiteurs de tyrosines kinases dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) ont conduit au développement d'inhibiteurs de JAK2 chez les sujets de risque intermédiaire 2 et haut risque. Le ruxolitinib (Jakavi®) est la seule molécule approuvée à l'heure actuelle par la commission européenne et la FDA, se basant sur deux études pivots : COMFORT (Controlled Myelofibrosis Study with Oral JAK Inhibitor Treatment) I et II [43] [44]. Le momelotinib et le pacritinib sont actuellement en cours d'étude de phase 3 et d'autres inhibiteurs de JAK2 sont dans des phases plus précoces de développement. Ces molécules permettent une réduction de splénomégalie dans 30% à

40% des cas ainsi qu'une diminution des signes généraux [43] [44] [45], donc une amélioration de la qualité de vie des patients [46]. L'impact sur la survie globale demeure controversé [47] [44]. Le momelotinib a de plus permis d'obtenir une indépendance transfusionnelle en culots globulaires chez certains patients [45]. Cependant, l'absence d'effets sur la charge allélique de *JAK2V617F* et sur la fibrose médullaire [43] [44] ainsi que des modèles murins et des études *in vitro* [48] [49] suggèrent que ces molécules n'auront pas de potentiel curatif dans les NMP. De plus, la toxicité hématologique, notamment sur la lignée plaquettaire pour le ruxolitinib et le momelotinib, restreint leur utilisation aux patients peu ou pas thrombopéniques. D'autre part, leurs effets secondaires respectifs (effet rebond à l'arrêt du traitement et immunosuppression pour le ruxolitinib [47] [50] [41], neuropathie périphérique, toxicités pancréatique et hépatique pour le momelotinib [51], [45], troubles gastro-intestinaux pour le pacritinib [52]) doivent être pris en compte. Le développement d'un de ces inhibiteurs, le fedratinib, a du notamment être stoppé en raison de cas d'encéphalopathies de Gayet-Wernicke [53, 54]. L'utilisation d'inhibiteurs de JAK2 avant allogreffe, afin d'en réduire la toxicité et d'augmenter le nombre de patients éligibles, est faisable et des études sont actuellement en cours pour définir leurs modalités d'administration dans ce contexte particulier [55] [56].

D'autres molécules, notamment des inhibiteurs de télomérases tel que l'imetelstat, dont les résultats préliminaires semblent prometteurs [57] [58] des inhibiteurs d'histones désacétylases ou d'HSP90 (Heat Shock protein), sont actuellement en cours de développement, seules ou en association, dans la MFP.

1.7. Aspects moléculaires

1.7.1. Altération de la voie JAK-STAT

Les NMP résultent de la transformation d'une CSH multipotente. Le mécanisme de transformation le plus fréquent est l'activation constitutive des voies de signalisation en aval du complexe récepteur à cytokines-JAK2.

1.7.1.1. La famille des Janus kinase (JAK)

La famille des JAK regroupe, chez les mammifères, 4 membres: JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (tyrosine kinase 2) [59]. JAK1, JAK2 et TYK2 sont exprimés dans toute l'hématopoïèse, alors que l'expression de JAK3 est restreinte à la lignée lymphoïde [60]. Ces tyrosines kinases s'associent aux récepteurs à cytokines de type I et II, dépourvus d'activité enzymatique, afin

de permettre la transduction du signal. La structure de ces grosses protéines (120-140 KDa) est caractérisée par 7 domaines présentant des similarités de séquence, appelés domaines JH (JAK homology). Leur région C-terminale contient deux domaines conservés: le domaine catalytique JH1 et le domaine JH2 ou domaine pseudo-kinase, qui régule négativement JH1 [61]. L'interaction entre les domaines JH1 et JH2 est nécessaire à une activation optimale de JAK2 [62]. Au niveau de JH3 et JH4 se situe un pseudo-domaine SH2 (Src homology 2) [63] [64] qui n'a pas de rôle dans la signalisation mais est structurellement important pour la spécificité de la liaison au récepteur et l'expression à la membrane cellulaire [65] [66]. Dans la partie N-terminale se trouve un domaine FERM (Band-4.1, ezrin, radixin, and moesin) qui permet la liaison à la box 1 située dans la région juxta-membranaire du récepteur auquel la kinase est associée [67].

Il existe différentes associations entre les JAK et les récepteurs de cytokines (Figure 1, inspirée de Vainchenker et al., *Semin Cell Dev Biol*, 2008 [68]).

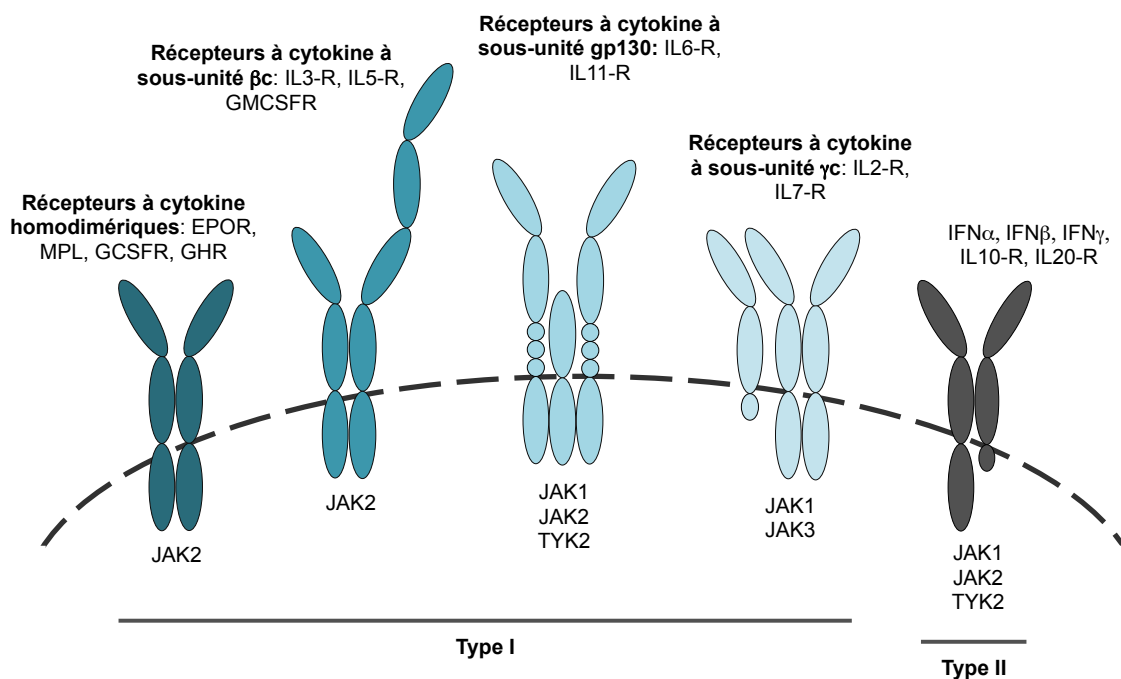


Figure 1 : Superfamille des récepteurs à cytokines et JAK associés.

Ils sont divisés en deux catégories: les récepteurs à cytokines de type I et II. Les récepteurs à cytokines de type I ne possèdent pas d'activité intrinsèque. Ils incluent les récepteurs homodimériques et les récepteurs à sous-unité βc, associés exclusivement à JAK2, ainsi que les récepteurs à sous-unité gp130 qui peuvent être activés par différents membres de la famille des JAK. Les récepteurs à cytokines de type II, regroupant essentiellement les récepteurs aux interférons, possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque et sont associés à JAK1, JAK2 et/ou TYK2.

1.7.1.2. JAK2 et signalisation

Découvert en 1992 [69], *JAK2*, situé en 9p24, est composé de 25 exons. La protéine, de 130 KDa, est constituée de 1132 acides aminés (AA) (Figure 2a). Il est le seul membre de la famille des JAK à s'associer à tous les récepteurs de type I homodimériques, en particulier les récepteurs à l'EPO (EPOR), à la thrombopoïétine (TPO), MPL, et au G-CSF (Granulocytes-colony stimulating factor), pour lesquels il joue le rôle de chaperonne, favorisant leur montée à la surface cellulaire et leur stabilité [70] [71, 72]. Ces récepteurs sont caractérisés par la présence dans leur partie extracellulaire de 4 résidus cystéine conservés, d'un motif WSXWS et de domaines fibronectine de type III, ainsi que des box1 et 2 dans la partie intra-cytoplasmique proximale [73]. *JAK2* s'associe également aux récepteurs à la prolactine et à la GH (growth hormone), aux récepteurs hétérodimériques au GM-CSF (granulocyte monocyte-colony stimulating factor), aux interleukines (IL) 3 et 5, ainsi qu'au récepteur de l'interféron gamma qui est un récepteur de cytokines de type II.

Le knock-out (KO) de *JAK2* entraîne la mort *in utero* des embryons à 12,5 jours, avec notamment une absence complète de progéniteurs érythroïdes et donc d'érythropoïèse [74]. Le KO conditionnel de *JAK2* dans le tissu hématopoïétique induit une diminution drastique de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse, ainsi que de la granulopoïèse, mais dans une moindre mesure, soulignant son rôle crucial dans l'hématopoïèse myéloïde [75].

A l'état basal, *JAK2* est pré-associé à la région juxta-membranaire du récepteur. La liaison d'une cytokine à son celui-ci va entraîner soit son homodimérisation (G-CSFR) [76] soit des changements conformationnels dans le cas d'homodimère préformé (EPOR) [77] [78]. Ceci provoque l'activation des molécules de *JAK2* par transphosphorylation au niveau des résidus Y1007 et 1008, situés dans la boucle d'activation du domaine kinase. La phosphorylation de Y1007 est nécessaire à la fonction kinase de *JAK2* [79]. Les *JAK2* activées phosphorylent alors les tyrosines conservées dans la partie intra-cytoplasmique des récepteurs [80], permettant le recrutement de protéines possédant un domaine SH2, impliquées dans les voies de signalisation des STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), des MAPK (Mitogen-Activated Protein kinase) et de la PI3K (Phosphoinositol Triphosphate kinase) (Figure 2b).

Il existe 7 protéines STAT chez les mammifères, STAT1-4, 5a, 5b et 6, impliquées dans la survie, la différenciation et la prolifération de divers types cellulaires. La voie des STAT est considérée comme la voie principale de signalisation activée par les JAK. STAT1, 3 et 5 peuvent être activés par *JAK2* en aval d'EPOR, de MPL et du G-CSFR [81]. A l'état inactif, les STAT sont localisés dans le cytoplasme sous forme de monomères. Les STAT sont recrutés au niveau des résidus tyrosines phosphorylés (p-Tyr) dans la partie intra-cytoplasmique du récepteur activé, permettant à *JAK2* de phosphoryler un résidu tyrosine situé dans leur région C-terminale, provoquant leur homo ou hétéro-dimérisation. Les

dimères de STAT activés vont ensuite se déplacer dans le noyau et entraîner la transcription de gènes cibles. D'autres tyrosines kinases que les JAK, ainsi que la phosphorylation d'un résidu sérine conservé dans la région C-terminale de STAT1, 3 et 4, peuvent également provoquer l'activation des STAT [82].

Les voies des MAPK, impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires, sont également activées par JAK2. La protéine adaptatrice GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2), recrutée au niveau du récepteur activé par liaison de son domaine SH2 à une p-Tyr, se lie à SOS qui est alors phosphorylée et active à son tour RAS, petite protéine à activité GTPase. Il s'en suit l'activation en cascade de RAF, MEK (MAPK/ERK Kinase) puis ERK (extracellular ligand-regulated kinase).

La voie de la PI3K joue un rôle important dans de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires, l'homéostasie du glucose et l'angiogenèse. PI3K est un hétérodimère à activité kinase composé de deux sous-unité : p110 qui possède une activité catalytique et p85, sous-unité régulatrice, qui agit comme une molécule adaptatrice [83]. Une fois activée par liaison de p85 au récepteur phosphorylé, la PI3K participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) qui recrute la sérine/thréonine kinase AKT via son domaine PH (plextrin homology), alors activée par phosphorylation. Une des cibles principales d'AKT est la sérine-thréonine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin), mais de nombreuses autres, impliquées dans la traduction, la transcription, le métabolisme ou l'apoptose, existent, comme FOXO3a (forkhead transcription factor 3A), GSK3 (Glycogen synthase kinase-3), BAD (bcl-associated death), P90^{rsk} (90 kDa ribosomal protein S6 kinase 1) et P70S6K (70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1).

L'amplitude et la durée du signal doivent être finement régulées afin de prévenir une activation anormale de ces voies de signalisation, risquant de provoquer une transformation maligne de la cellule. Plusieurs mécanismes de régulation négative du signal existent (Figure 2b).

SHP1 est une tyrosine phosphatase exprimée essentiellement dans le tissu hématopoïétique. Les souris déficientes pour SHP1 présentent une expansion anormale du compartiment myéloïde. SHP1 est caractérisée par deux domaines SH2, lui permettant de se lier à la fois au récepteur activé et à JAK2, provoquant sa déphosphorylation et donc la terminaison du signal [84]. SHP1 peut également inactiver JAK2 directement, indépendamment de ses domaines SH2 [85].

La famille des protéines SOCS (Supressor Of Cytokine Signaling proteins) est composée de 8 membres (SOCS 1 à 7 et CIS - cytokine-inducible SH2-containing protein), caractérisés par la présence d'un domaine SH2 central, d'un domaine spécifique de 40 AA conservés appelé SOCS-box en C-terminal et d'un domaine N-terminal variable [86]. SOCS1, SOCS3

et CIS régulent négativement la signalisation due à JAK2. CIS est notamment une des cibles transcriptionnelles de STAT5 et agit donc comme une boucle de rétrocontrôle négatif classique. Les SOCS peuvent entrer en compétition allostérique avec les STAT pour la liaison au récepteur, par l'intermédiaire de leur domaine SH2 [87]. D'autre part, SOCS1 et SOCS3 possèdent dans leur région N-terminale une séquence conservée de 12 acides aminés qui constitue un domaine KIR (Kinase Inhibitory Region). Celui-ci se comporterait comme un pseudo-substrat pour JAK2, inhibant directement son activité enzymatique [88]. SOCS1 peut se lier directement aux JAK alors que SOCS3 ne peut exercer son activité que s'il est également lié au récepteur [89]. Enfin, les SOCS, par l'intermédiaire de leur SOCS box, peuvent recruter le complexe ubiquitine-ligase et induire la dégradation par le protéasome de JAK2. Les SOCS associent donc une activité inhibitrice spécifique par l'intermédiaire de leurs domaines SH2 et KIR et un mécanisme de dégradation protéique classique par la voie du protéasome grâce à leur SOCS-box [90].

LNK (codée par *SH2B3*) est une protéine adaptatrice qui, par l'intermédiaire de son domaine SH2, atténue l'activation de JAK2 et donc le signal d'EPOR et de MPL [91, 92].

CBL (Casitas B-lineage lymphoma) est une E3-ligase qui, par ubiquitination de JAK2 et du récepteur associé, entraîne leur dégradation par le protéasome et la voie des lysosomes.

Les PIAS (Protein inhibitors of activated STATs family) régulent négativement la voie JAK-STAT [93] par inhibition directe de la liaison des STAT à l'ADN, par le recrutement de molécules réprimant la transcription comme les HDAC (Histone désacétylases), ainsi qu'en entraînant la sumoylation des STAT.

SHIP (SH2-containing inositol-5 phosphate) est impliqué dans la terminaison de la voie PI3K. Le KO homozygote est viable dans 40% des cas mais les souris présentent des anomalies du système hématopoïétique notamment une réduction du nombre de CFU-E (Colony Forming Unit-Erythrocyte) dans la moelle [94].

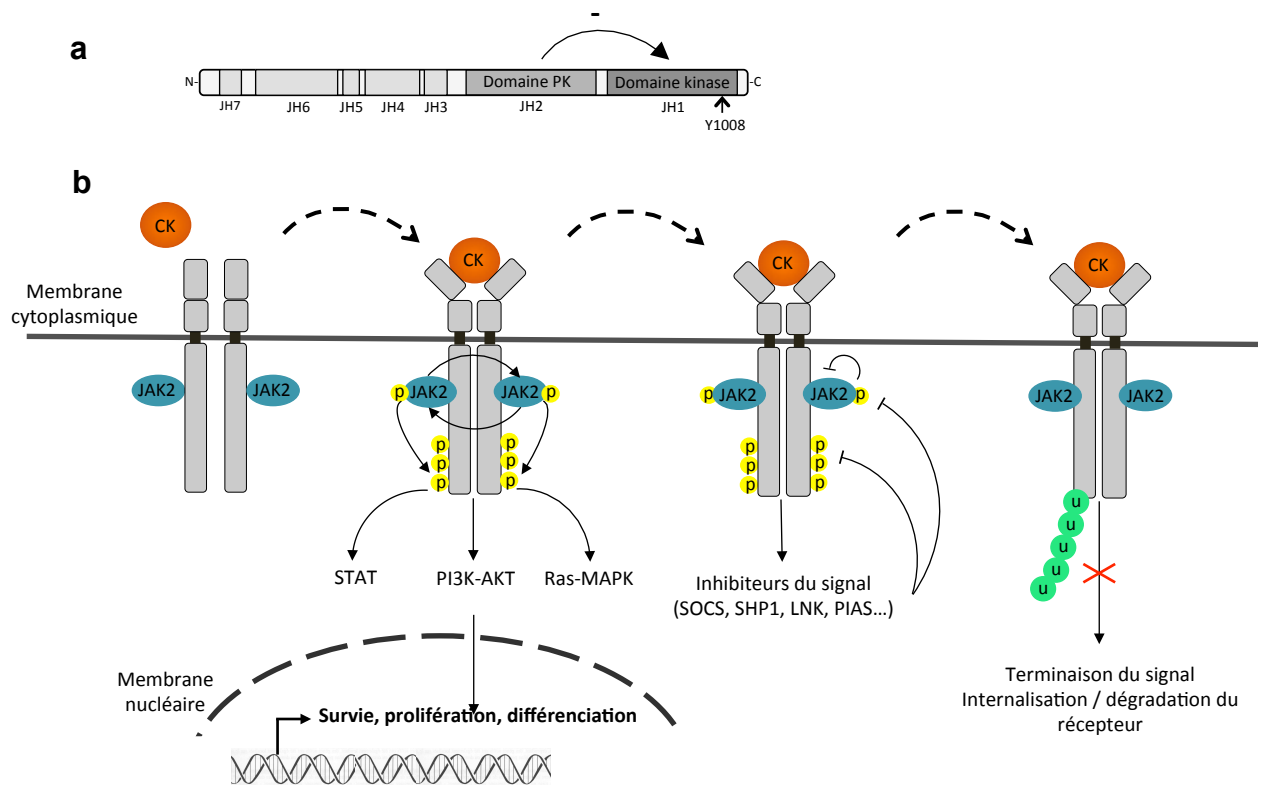


Figure 2 : Activation physiologique des récepteurs à cytokines homodimériques

(a): Structure de JAK2. Le domaine pseudo-kinase (PK, JH2) inhibe le domaine kinase JH1. JH: jak homology domain. (b): Mécanisme d'activation du récepteur par liaison de la cytokine: En absence de cytokine, le récepteur est couplé à JAK2 en conformation inactive. La liaison de la cytokine entraîne l'activation des molécules JAK2 par transphosphorylation, qui phosphorylent des tyrosines conservées dans la partie intra-cytoplasmique du récepteur, permettant le recrutement de molécules de signalisation par leur domaine SH2. Les voies de signalisation en aval (STAT, PI3K, MAPK) sont alors activées, induisant la survie, la prolifération et la différenciation des cellules myéloïdes. La régulation négative du signal s'effectue par auto-inhibition de JAK2, déphosphorylation (SHP-1), compétition avec les STAT (PIAS, SOCS), ubiquitination (Cbl) et inactivation de JAK2 (LNK), conduisant à la terminaison du signal et l'internalisation du récepteur.

1.7.1.3. JAK2V617F

La découverte de la mutation *JAK2V617F* en 2005 [95-98] a été une étape cruciale dans la compréhension du mécanisme de développement des NMP. Initialement décrite dans les NMP classiques non BCR-ABL, elle a par la suite été mise en évidence dans certains cas de NMP atypiques comme la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), de syndromes myélodysplasiques notamment d'ARSI-T (anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose) et de LAM [99] [100] [101] [102] [103]. Située dans l'exon 14, il s'agit d'une transversion c.1849G>T, responsable de la substitution d'une valine en phénylalanine au niveau du domaine pseudo-kinase JH2. Elle entraîne la levée de l'auto inhibition de JH2 sur le domaine kinase JH1 et donc l'activation constitutive de JAK2 et des voies de signalisation en aval (Figure 3).

JAK2V617F est retrouvée dans 95% des PV et 50% à 60% des TE et MFP (Figure 4). Une question majeure est de comprendre comment une mutation apparaissant au niveau d'une même CSH [1] peut être à l'origine de différents phénotypes. Tous les modèles murins (rétroviraux, knock-in (KI) ou transgéniques) reproduisent la maladie et son évolution en myélofibrose. Dans les modèles murins KI, *JAK2V617F* induit un phénotype proche de celui des PV avec progression vers une MF [104]. Dans les modèles de souris transgéniques, le niveau d'expression de *JAK2V617F* peut induire soit un phénotype de TE (bas niveau d'expression), soit un phénotype de PV (haut niveau d'expression) [105] [106]. Ces résultats concordent avec les niveaux d'expression de *JAK2V617F* observés chez l'homme, puisque dans la plupart des TE le clone *JAK2V617F* est exclusivement hétérozygote alors que des clones homozygotes sont observés dans la plupart des PV, par un mécanisme de recombinaison mitotique au niveau du locus de *JAK2*, et qu'il envahit tous les lignages hématopoïétiques dans la MFP. Le phénotype peut également varier selon les partenaires cellulaires interagissant avec *JAK2* muté, par exemple *STAT5* dans les PV et *STAT1* dans les TE [107]. En effet, il a été montré, dans des souris KO pour *STAT1* croisées avec des souris transgéniques *JAK2V617F*, une inhibition de la mégacaryopoïèse et donc une absence de thrombocytose [108]. Le fond génétique dans lequel *JAK2V617F* apparaît pourrait, notamment par la présence de différents polymorphismes constitutionnels (fond génétique), expliquer les différences de phénotypiques observées [109]. De plus, l'association à d'autres mutations, en particulier des mutations de régulateurs de l'épigénétique ou de l'épissage dans les MFP, pourrait également avoir un impact sur le phénotype de la maladie. Deux études ont montré, dans des modèles murins, que l'association de *JAK2V617F* avec la perte de fonction d'*EZH2* (Enhancer of zeste homolog 2) accélérât le développement de la MF [110] [111]. Enfin, l'ordre d'apparition des mutations pourrait également avoir un impact sur le phénotype de la maladie. En effet, deux études récentes ont montré que l'acquisition d'une mutation de *TET2* ou de *DNMT3A* avant *JAK2V617F* résultait en un phénotype de TE alors que lorsque *JAK2V617F* précédait ces deux mutations, les patients développaient plus fréquemment une PV [112] [113].

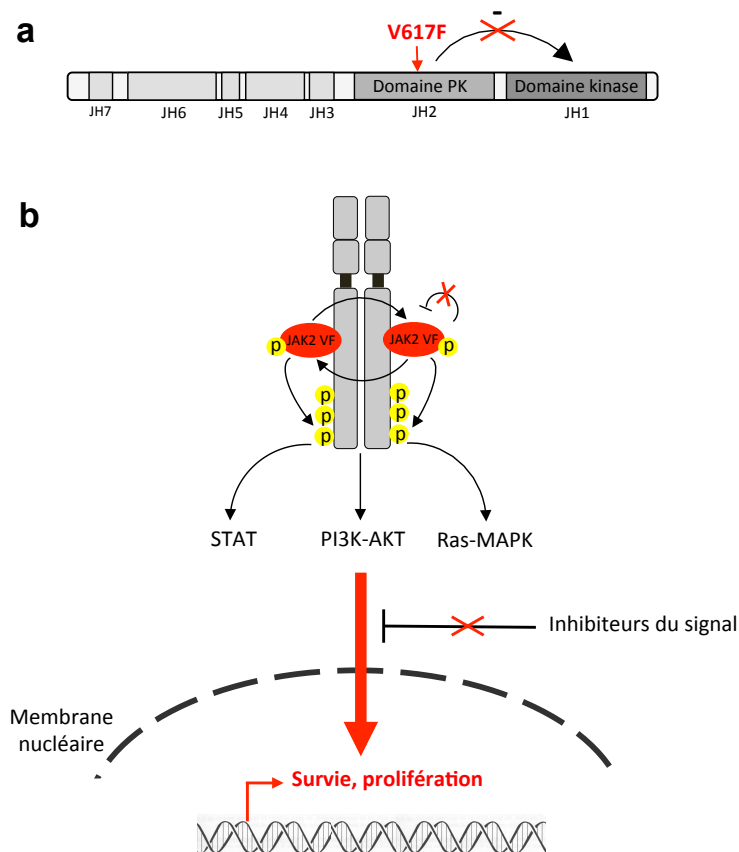


Figure 3 : Mutation JAK2 V617F.

(a): En présence de la mutation JAK2 V617F, perte de l'auto-inhibition de l'activité kinase de JAK2 exercée par le domaine pseudo-kinase (PK). (b): JAK2 V617F est activé constitutivement en absence de cytokine et entraîne une signalisation anormale non régulées des voies STAT, PI3K et MAPK, entraînant une prolifération et une survie anormale des cellules myéloïdes.

1.7.1.4. Mutations dans l'exon 12 de JAK2

Environ 2% à 3% des sujets atteints de PV sont porteurs de mutations acquises hétérozygotes de *JAK2* situées au niveau de l'exon 12 [114] (Figure 4). La PV est donc associée quasi exclusivement à des mutations gain de fonction de *JAK2*. Ces mutations ne sont pas observées dans les TE ni les MFP. Cliniquement, ces patients présentent généralement une polyglobulie isolée, proche du phénotype observé dans les érythrocytoses, avec des taux d'EPO circulant normaux ou bas. La présence d'une pousse autonome des progéniteurs érythroïdes et le risque de transformation en MF les différencient cependant des érythrocytoses qui sont des pathologies polyclonales bénignes [115]. Ce phénotype érythroïde particulier pourrait être dû à une activation constitutive des mutants

JAK2 exon 12 plus importante que celle observée pour *JAK2V617F* ou bien à une spécificité d'action sur EPOR [115].

1.7.1.5. Mutations de *MPL*

MPL est situé en 1p34 et est constitué de 12 exons. *MPL*, d'environ 70KDa, est le récepteur à la TPO, synthétisée dans le foie et principal régulateur de la mégacaryopoïèse [116] [117] [118]. Il appartient à la famille des récepteurs homodimériques de type I [119]. Il est exprimé spécifiquement dans le tissu hématopoïétique, au niveau du compartiment des CSH et de l'ensemble de la lignée mégacaryocytaire [120] [121].

Les modèles murins pour *MPL* et la TPO soulignent leur rôle crucial dans la mégacaryopoïèse. Bien que le KO de *MPL* soit viable, les souris présentent une thrombopénie profonde [118]. Un phénotype semblable est observé dans les KO conditionnels dans la lignée mégacaryocytaire de *MPL* [122]. Dans les modèles de souris transgéniques, la surexpression de la TPO entraîne une thrombocytose évoluant en myélofibrose [123] [124] [125] [126]. Le KO conditionnel de *MPL* dans les mégacaryocytes et les plaquettes, qui provoque de façon inattendue une expansion anormale des mégacaryocytes et une thrombocytose, a permis d'améliorer la compréhension des fonctions de *MPL* et de la TPO dans la mégacaryopoïèse : cette dernière est stimulée au niveau des progéniteurs hématopoïétiques exprimant *MPL* par la TPO et *MPL* régule négativement la quantité de TPO disponible par son internalisation et sa dégradation au niveau des cellules plus matures, évitant une surproduction de plaquettes [122].

Après liaison de la TPO à *MPL*, plusieurs voies de signalisation sont activées en aval par l'intermédiaire de *JAK2* [127] : les STAT 1, 3 et 5, la voie PI3K-AKT et la voie des MAPK [128] [129]. Elles favorisent la survie, la prolifération et la différenciation du compartiment des CSH et des cellules engagées dans la voie mégacaryocytaire, la maturation des MK et l'activation des plaquettes [130] [131] [132] [133].

En 2006, la mutation acquise *MPLW515L* a été décrite chez des patients atteints de MFP *JAK2V617F* négatives [134]. Il s'agit d'une transversion c.1544G>T dans l'exon 10, résultant en la substitution d'un tryptophane par une leucine en position 515, au niveau d'un motif amphipathique constitué de 5 AA, localisé à la jonction entre le domaine transmembranaire et la région intra-cytoplasmique, qui prévient l'activation spontanée du récepteur [135]. Il a été démontré que *MPLW515L* doit être exprimé à la membrane pour que *JAK2* soit activé [136]. D'autres mutations du résidu tryptophane W515 (*W515K*, *W515S*, *W515N*, *W515R*, *W515A*) ont par la suite été mises en évidence [137] [138], ainsi que la mutation *MPLS505N*, identifiée initialement à l'état germinale dans des cas familiaux de NMP puis à l'état somatique dans des cas sporadiques [139]. Comme dans le cas de *JAK2V617F*, les mutations

MPLW515 surviennent au niveau du compartiment des CSH. Ces mutations de *MPL* sont observées dans 8% à 10% des TE et MFP [140] (Figure 4). Entraînant une activation spontanée de *MPL*, elles sont responsables dans les lignées cellulaires d'une pousse autonome et d'une hypersensibilité à la TPO. Dans les modèles rétroviraux et transgéniques murins, *MPLW515L* induit une thrombocytose progressant en myélofibrose [134].

Habituellement exclusives, *JAK2V617F* et *MPLW515X* ont été observées de façon concomitante chez de rares patients, cependant il est probable qu'il s'agisse de clones différents, soulignant la complexité de ces pathologies [140].

1.7.1.6. Mutations de *CALR*

CALR est localisé en 19p13.2 et contient 9 exons. *CALR* est une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique (RE) qui favorise le repliement des glycoprotéines. Elle joue également un rôle dans l'homéostasie du calcium [141]. Elle possède une extrémité N-terminale riche en prolines et une extrémité C-terminale contenant un domaine KDEL de rétention dans le RE et un domaine de liaison au calcium, chargé négativement. Le KO de *CALR* est létal en raison d'anomalies du développement cardiaque [142].

Plus d'une cinquantaine de mutations hétérozygotes de *CALR* ont été identifiées [143] dans environ 15% à 25% des TE et MFP [144] [145] [146] (Figure 4). Leur présence a été rapportée dans de rares cas de PV [147]. Il s'agit d'insertions et/ou de délétions plus ou moins complexes au niveau de l'exon 9 qui conduisent toutes à un décalage du cadre de lecture, modifiant l'extrémité C-terminale de *CALR*, avec d'une part la perte du motif KDEL et d'autre part la modification de la charge de la protéine puisque les AA chargés négativement sont remplacés par des AA de charge neutre ou positive. Les deux plus fréquemment observées sont des délétions de 52pb (del52) et des insertions de 5pb (ins5), dans 53% et 32% des cas respectivement [144] [145] [148]. Les mutations *JAK2V617F*, *MPLW515X* et *CALR* sont considérées comme mutuellement exclusives, cependant certains cas de patients atteints de NMP mutés *JAK2V617F* et *CALR* ont été rapportés, témoignant probablement de la présence de deux clones pathologiques [149] [150] [151] [146] [152]. Les mutations de *CALR* ont été observées associées à BCR-ABL dans de rares cas [153] [154] [155], comme cela a pu être précédemment décrit avec *JAK2V617F* [156].

Les mutations de *CALR* induisent dans la lignée cellulaire Ba/F3 une pousse autonome, qui est abolie en présence d'inhibiteur de *JAK2* [144]. Dans un modèle rétroviral murin, les mutations de *CALR* étaient responsables d'une thrombocytose évoluant vers une MF, mimant l'évolution naturelle des NMP chez les patients. Les CFU-MK présentaient une hypersensibilité à la TPO [157]. Ces données suggèrent donc que les mutations de *CALR*

sont reliées à une activation anormale de JAK2, possiblement dépendante de MPL, corroborant le fait qu'elles sont observées quasi exclusivement dans les TE et MFP.

Les mutations de *CALR*, comparées aux mutations *JAK2V617F*, sont retrouvées chez des patients plus jeunes, avec des taux d'hémoglobine et de leucocytes plus bas, des taux de plaquettes plus élevés et une diminution du risque thromboembolique. Elles ne semblent pas avoir d'impact sur la survie globale [23] [158] [159] [14]. Nous avons confirmé dans le laboratoire ces données, par l'étude d'une cohorte de 572 patients, dont 368 patients porteurs de mutations de *CALR* et 204 patients triple négatifs. Les patients mutés *CALR* sont effectivement plus jeunes, avec une maladie se déclarant une dizaine d'années plus tôt que pour les sujets mutés *JAK2V617F*, et avaient des taux de plaquettes plus élevés. Nous avons mis en évidence une différence de phénotype entre les mutations de *CALR* del52 et ins5 : la del52 est très majoritaire dans les MFP avec une charge allélique toujours élevée alors que les ins5 sont retrouvées essentiellement des TE chez des sujets plus jeunes avec des chiffres de plaquettes plus élevés. Les TE triples négatives étaient essentiellement observées chez des femmes jeunes avec des thrombocytoses modérées [148] (Annexe 1).

Les mutations de *JAK2*, *MPL* ou *CALR* ont donc une fonction « drivers » dans le développement de la maladie et font désormais partie des critères diagnostiques majeurs des NMP. Leur recherche doit être systématique en absence de *JAK2V617F* [8]. Les patients qui ne présentent aucune de ces mutations sont dits « triples négatifs » et représentent en 10% à 15% des TE et MFP. La mise en évidence de nouvelles mutations « driver » chez ces patients permettrait de compléter le spectre des anomalies moléculaires des NMP.

1.7.1.7. Mutations de régulateurs négatifs de la voie des JAK

De rares mutations de *LNK*, essentiellement localisées dans le domaine SH2 et le domaine PH de liaison au PIP3, ont été décrites dans environ 3% des NMP, en particulier dans les TE et les MFP, ainsi que dans 13% des LAM post-NMP [160] [161]. Elles peuvent être associées à *JAK2V617F* [161]. Ces mutations sont responsables d'une hypersensibilité à la TPO et d'une activation anormale de la voie JAK-STAT dans les lignées cellulaires et les cellules primaires [162]. Les souris *LNK^{-/-}* présentent une splénomégalie, une hématopoïèse extra-médullaire et une thrombocytose [163]. Ces mutations seraient associées à un pronostic péjoratif [164].

L'observation d'une disomie uniparentale en 11q a permis d'identifier des mutations de *CBL* dans environ 4% des PMF [165], mais aussi dans des cas de LMC transformées et de

LMMC. Il s'agit en majorité de mutations faux sens au niveau du domaine RING ou du domaine linker de CBL qui inhibent son activité ubiquitine ligase [166] [167].

1.7.2. Mutations de facteurs d'épissage et de régulateurs de l'épigénétique

Les mutations qui touchent la voie de signalisation récepteur de cytokines/JAK2 (mutations de *JAK2*, *MPL*, *CALR*, *CBL*, *LNK*) sont clairement impliquées dans le phénotype de la maladie et sont essentiellement observées dans les NMP. Elles peuvent être associées à des mutations de régulateurs de l'épigénétique ou de facteur d'épissage, qui sont retrouvées dans d'autres pathologies myéloïdes (LAM, SMD), lymphoïdes et dans certaines tumeurs solides. Ces mutations peuvent précéder ou suivre les mutations de signalisation. Si elles ne sont pas responsables du développement du NMP, elles peuvent cependant modifier le phénotype ou l'évolution de la maladie. (Figure 4)

1.7.2.1. Mutations de régulateurs de l'épissage

Les mutations de facteurs de l'épissage (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *SFR3A1*...) sont relativement rares dans les NMP avec une fréquence de 9.4% et concernent essentiellement les MFP [168].

Les plus fréquentes sont les mutations de *SRSF2* (Serine/arginine-rich splicing factor 2), observées dans 17% des MFP et 19% des LAM secondaires à un NMP. Elles sont associées à un pronostic péjoratif et une diminution de la survie globale [169] [170].

Les mutations de *SF3B1* (splicing factor 3b subunit 1), associées généralement aux ARSI-T, sont retrouvées dans environ 5% des MFP et 3% des TE [168] [171]. Elles sont associées à la présence de sidéroblastes en couronne dans la moelle osseuse et ne semblent pas avoir d'impact pronostique [171].

1.7.2.2. Mutation des régulateurs de l'épigénétique

Les modifications épigénétiques telles que la méthylation ou l'acétylation des histones permettent de réguler la transcription de gènes sans altérer la structure de l'ADN. Elles sont donc réversibles et ses régulateurs de potentielles cibles thérapeutiques.

1.7.2.2.1. Mutations de *TET2*

La famille TET comprend 3 membres, TET1, TET2 et TET3, qui catalysent l'hydroxylation de la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine, entraînant une déméthylation de l'ADN [172]. A partir de l'observation de perte d'hétérozygotie au niveau du locus de *TET2* en 4q24, des mutations somatiques perte de fonction de ce gène ont pu être mises en évidence dans 12% des MPN [173]. Elles sont observées dans environ 4% des TE, 10% à 16% des PV et 8% à 15% des MFP [174] [175]. L'étude de cellules primaires de patients et de différents modèles murins déficients pour *TET2* ont mis en évidence une amplification du compartiment des CSH et des progéniteurs, ainsi qu'un phénotype s'approchant de celui d'une LMMC [173] [176] [177] [178]. Le croisement de souris *JAK2V617F* et *TET2* KO a montré une progression plus rapide de la maladie et une amplification des progéniteurs immatures *JAK2V617F*, soulignant le rôle de *TET2* dans la dominance clonale [179]. Cependant, des mutations de *TET2* associées à une hématoïèse clonale ayant été mises en évidence chez des sujets âgés ne présentant pas de signes d'hémopathie [180], se pose la question de son rôle dans le développement de ses pathologies. D'autre part, l'impact pronostique des mutations de *TET2* demeure controversé dans les NMP.

1.7.2.2.2. Mutations d'*IDH1/2*

IDH1 et 2 catalysent la décarboxylation de l'isocitrate conduisant à la production de 2-oxoglutarate et de CO₂. Les mutations d'*IDH1/2* ont été mises initialement en évidence dans les LAM [181]. Ces mutants possèdent une nouvelle fonction conduisant à la production de 2-hydroxyglutarate (2-HG) qui inhibe certaines enzymes dépendantes du 2-oxoglutarate, notamment les enzymes de la famille TET [182]. L'élévation du 2-HG dans le sérum permet de prédire la présence des mutations d'*IDH1/2* et a un impact pronostique sur la survie des patients atteints de LAM [183]. Environ 2% des NMP en phase chronique présentent des mutations d'*IDH1/2* alors que leur prévalence est de 21.6% dans les LAM post-NMP [184] [185]. Elles sont donc associées au risque de transformation.

1.7.2.2.3. Mutations de *DNMT3A*

DNMT3A est une méthyl-transférase. Des mutations, généralement hétérozygotes, de *DNMT3A* sont observées dans environ 9% des NMP mais sont plus fréquentes dans les MFP et les LAM post-NMP (10%-15%) [186] [187]. Un modèle murin de KO conditionnel de *DNMT3A* a mis en évidence, après transplantations sériées, une expansion du compartiment des CSH avec une diminution de la différenciation sans développement de phénotype malin

[188], suggérant que DNMT3 et TET2 pourraient jouer un rôle similaire au niveau de l'amplification des progéniteurs et de l'induction de la dominance clonale.

1.7.2.2.4. Mutation d'ASXL1

ASXL1 est une protéine nucléaire qui peut agir en tant qu'activateur ou répresseur de la transcription, notamment par modification des histones. Les mutations d'ASXL1 sont hétérozygotes. Il s'agit de mutations perte de fonction responsables d'une haplo-insuffisance chez les patients [189]. Elles sont retrouvées dans 2% à 5% des PV, 5% à 8% des TE, 7% à 17% des MFP et dans environ 20% des LAM secondaires [190]. Les souris *ASXL1*^{-/-} présentent notamment un phénotype de SMD [191]. Les mutations d'ASXL1 sont de mauvais pronostic dans les NMP, associées à une diminution de la survie et au risque de transformation en LAM [190].

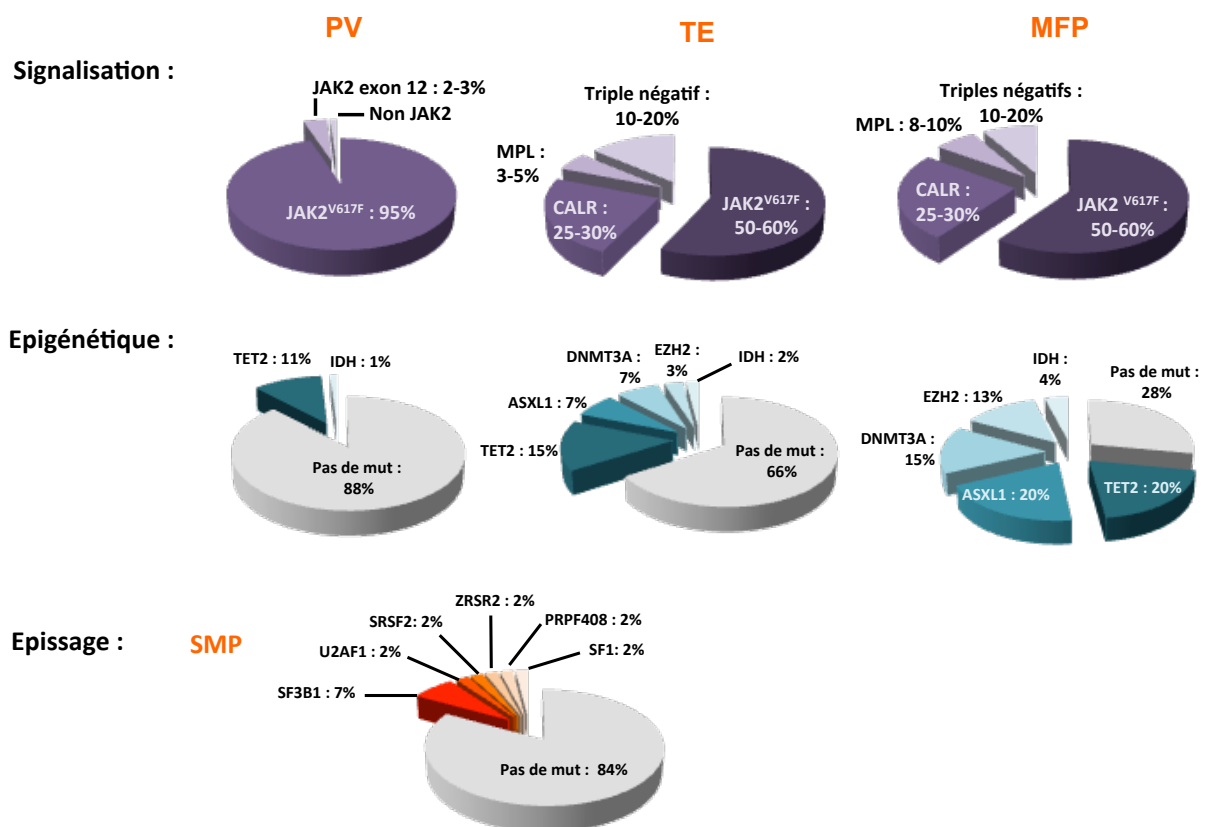


Figure 4 : Mutations de signalisation, de régulateurs de l'épigénétique et de facteurs d'épissage décrits dans les NMP

1.7.3. Autres mutations associées à la transformation en LAM secondaires

Les mutations d'*IDH1/2* ou d'*ASXL1* sont associées au risque de transformation en LAM secondaire. D'autres mutations, également non spécifiques des NMP, peuvent aussi être acquises lors de la progression de la maladie.

Des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53*, le plus souvent bi-alléliques et associées à une disomie uniparentale en 17p, sont retrouvées dans 27.3% des LAM post-NMP contre 4.3% des LAM *de novo* et 1.6% des NMP en phase chronique, où elles sont de plus généralement mono-alléliques [192] [193]. De plus, des amplifications de *MDM4*, qui inhibe p53 [194], peuvent également être mises en évidence. Des mutations d'*IKZF1* (IKAROS family zinc finger 1) ou des délétion 7p sont observées dans 19% des LAM post-NMP [195]. *In vitro*, le knock-down d'IKAROS induit une hypersensibilité aux cytokines et la surexpression d'un dominant négatif active la voie de signalisation JAK-STAT [195] [196]. Les anomalies d'*IKZF1* sont retrouvées à la même fréquence dans les LAM post-NMP et les LAM *de novo*. La délétion 7q a été reliée à la perte du facteur de transcription (FT) CUX1, régulateur du cycle cellulaire [197], et apparaît, comme les mutations de *TP53*, relativement spécifiques des LAM secondaires. Des mutations de *RUNX1* (runt-related transcription factor 1) et des délétions d'*ETV6* (ets variant 6) (del12p) ont également été décrites dans les LAM post-NMP [192]. Seules les mutations de *TP53* ont un impact pronostique péjoratif pour la survie des patients atteints de LAM secondaires [192].

Article 1 :

**Myeloproliferative Neoplasms: JAK2 Signaling Pathway as
a Central Target for Therapy**



Myeloproliferative Neoplasms: JAK2 Signaling Pathway as a Central Target for Therapy

Florence Pasquier,^{1,2,3,4} Xenia Cabagnols,^{1,2,3,4} Lise Secardin,^{1,2,3,4}
Isabelle Plo,^{1,2,3,4} William Vainchenker^{1,2,3,4}

Abstract

The discovery of the *JAK2V617F* mutation followed by the discovery of other genetic abnormalities allowed important progress in the understanding of the pathogenesis and management of myeloproliferative neoplasms (MPN)s. Classical Breakpoint cluster region-Abelson (*BCR-ABL*)-negative neoplasms include 3 main disorders: essential thrombocythemia (ET), polycythemia vera (PV), and primary myelofibrosis (PMF). Genomic studies have shown that these disorders are more heterogeneous than previously thought with 3 main entities corresponding to different gene mutations: the *JAK2* disorder, essentially due to *JAK2V617F* mutation, which includes nearly all PVs and a majority of ETs and PMFs with a continuum between these diseases and the myeloproliferative leukemia (MPL) and calreticulin (*CALR*) disorders, which include a fraction of ET and PMF. All of these mutations lead to a *JAK2* constitutive activation. Murine models either with *JAK2V617F* or *MPLW515L*, but also with *JAK2* or *MPL* germ line mutations found in hereditary thrombocytosis, have demonstrated that they are drivers of myeloproliferation. However, the myeloproliferative driver mutation is still unknown in approximately 15% of ET and PMF, but appears to also target the *JAK*/Signal Transducer and Activator of Transcription (*STAT*) pathway. However, other mutations in genes involved in epigenetics or splicing also can be present and can predate or follow mutations in signaling. They are involved either in clonal dominance or in phenotypic changes, more particularly in PMF. They can be associated with leukemic progression and might have an important prognostic value such as additional sex comb-like 1 mutations. Despite this heterogeneity, it is tempting to target *JAK2* and its signaling for therapy. However in PMF, Adenosine Tri-Phosphate (ATP)-competitive *JAK2* inhibitors have shown their interest, but also their important limitations. Thus, other approaches are required, which are discussed in this review.

Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, Vol. 14, No. S3, S23-35 © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Calreticulin, Clinical management, Inhibitors, MPL, Pathogenesis

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal hematopoietic disorders characterized by an increased number of mature myeloid peripheral blood cells.¹ The World Health Organization classification distinguishes 3 classical Philadelphia-negative MPN: polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). Until 2005 and the discovery of a somatic point mutation in Janus-Activated Kinase 2 (*JAK2*) tyrosine kinase (*JAK2V617F*), the genomic landscape of MPN was unknown. Based on the hypothesis that *JAK/STAT* signaling is central to the

pathogenesis of *JAK2V617F*-negative MPN, genomic studies have identified several mutations in genes coding for proteins involved in this signaling pathway such as Myeloproliferative leukemia (*MPL*), *LNK*, and Casitas B-lineage lymphoma (*CBL*), and more recently and unexpectedly in coding calreticulin (*CALR*). These mutations result in an abnormal overactivation of the *JAK/STAT* signaling and a selective advantage to the myeloid lineage. However, genomic studies have also shown that MPN are much more heterogeneous disorders than initially thought and that genetic alterations in signaling molecules do not completely resume their entire pathogenesis. This is particularly true for PMF, which, in some aspects is closer to myelodysplastic syndromes (MDS) than to MPN.

Myeloproliferative Neoplasms are Signaling Disorders Leading to *JAK2* Activation

*The *JAK2* Mutations and MPN*

*High Prevalence of *JAK2V617F* in MPN.* The *JAK2V617F* mutation is located in the pseudokinase autoinhibitory domain of the

¹INSERM 1009, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

²Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

³Université Paris XI, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

⁴Ligue Nationale contre le Cancer, équipe labellisée, Villejuif, France

Submitted: Feb 21, 2014; Accepted: Jun 4, 2014

Address for correspondence: William Vainchenker, MD, PhD, INSERM U71009, PR1, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif (France)
Fax number: +33-1-42-11-52-40; e-mail contact: verpre@igr.fr

JAK2 and Myeloproliferative Neoplasms

protein,²⁻⁵ leading to the loss of normal negative regulatory interaction with the kinase domain and thus constitutive activation of the kinase. In the presence of homodimeric type 1 cytokine receptors, JAK2V617F autophosphorylates and mediates the activation of downstream signaling pathways such as the STATs (STAT5, STAT3, and STAT1), the ERK/mitogen-activated protein kinase (MAPK), and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR).

The different *jak2V617F* murine models mimic the human disorders,⁶⁻⁹ thus, *JAK2V617F* is the main driver mutation responsible for the myeloproliferative phenotype. However, *JAK2V617F* might not be the initiating molecular event. Indeed, *JAK2V617F* is found associated with other mutations, which by themselves do not give rise to myeloproliferative disorders.

JAK2V617F is present in 95% of PV, 65% of ET, and 60% to 50% of PMF. A major question is how a single mutation can give rise to different phenotypes. Strong evidence suggests that in humans, ET is related to the expansion of a heterozygous *JAK2V617F* clone whereas in most PV a homozygous *JAK2V617F* clone is prevalent and results from uniparental disomy at the *JAK2* locus.¹⁰ It has been shown that a *JAK2V617F* protein threshold level has to be reached to allow maximum constitutive activation of downstream signaling proteins and thus a complete cytokine independence. In murine models, low levels of *Jak2V617F* give an ET-like phenotype, whereas high levels are associated with a PV-like phenotype.^{8,9} Nevertheless, other cellular components play a role in determining the MPN phenotype such as the isoform of STAT being activated by *JAK2V617F*. STAT5 activation is a key factor in the development of a PV, whereas STAT1 activation in the erythroid lineage has been linked to an ET phenotype due an inhibition of erythroid differentiation.^{11,12} Thus, it is possible that germ line determinants including sex might also play an important role in the phenotype of *JAK2V617F* MPN.

In most PV and ET, the *JAK2V617F* clone(s) is associated with wild type *JAK2* clones (presumably normal cells). The mechanism for clonal dominance of the mutated clone might rely on additional somatic mutations that might either precede or follow environmental changes (inflammation) due to *JAK2V617F*. None of the murine *Jak2V617F* models gives rise to a PMF. This finding correlates well with the human disease in which several other mutations in genes also found in MDS, are present in addition to *JAK2V617F* and can profoundly alter the hematopoietic differentiation.

Other JAK2 Mutations Might Be Present in MPN. To identify the molecular abnormalities present in the remaining 5% *JAK2V617F*-negative PV, Scott et al sequenced the entire *JAK2* gene in the erythroid cells of these patients and found different mutations in exon 12 (2%-4% of PV), which were not present in ET and PMF.¹³ More specifically, these mutations led to the induction of an erythrocytosis phenotype although disease in patients with *JAK2* exon 12—mutation can transform into myelofibrosis. The erythroid colonies from patients who present with *JAK2* exon 12 mutations are rarely homozygous for the *JAK2* mutation in contrast to *JAK2V617F*-positive PV. It has been suggested that this relatively pure erythroid phenotype is related to the greater constitutive activity of *JAK2* exon 12 compared with *JAK2V617F*.

Other rare *JAK2* mutations have also been found in MPN.

MPL Mutations

MPL is the thrombopoietin (TPO) receptor that belongs to the homodimeric type I cytokine receptor family and requires JAK2 to mediate signaling. Murine models have shown that TPO overexpression leads to a thrombocytosis followed by the development of a myelofibrosis, suggesting that the TPO receptor MPL/JAK2 pathway plays a central role in the development of ET and PMF.¹⁴ Pikman et al sequenced *MPL* and found mutations at codon 515 in exon 10.¹⁵ *MPL* contains a 5-amino acid amphipathic motif located at the junction of the transmembrane and cytoplasmic domains, which prevents constitutive *MPL* activation.¹⁶ Substitution of W515 leads to the receptor activation. Five main *MPL* mutations have been reported, all present in exon 10 and affecting 2 amino acids: W515L, W515K, W515A, W515R, and S505N. The most prevalent mutations are W515L and W515K. They are present in 3% of ET and 5% to 10% of PMF, but not in PV.¹⁷ The S505N mutation was initially identified in hereditary thrombocytosis and was also reported in rare sporadic cases.¹⁸ In retroviral murine models, *MPL* W515L induces a disorder recapitulating human myelofibrosis.¹⁵ A small number of patients with *JAK2* and *MPL* mutations have been reported, probably in different clones.¹⁷

Other rare mutations in *MPL* also can be present in MPN.

SH2B3 Mutations

SH2B adaptor protein (SH2B3) (LNK), a negative regulator of JAK/STAT signaling, is mutated with a low frequency in patients with MPN with a low frequency (3%).¹⁹ SH2B3 is an adaptor protein that negatively regulates JAK2 activity by binding directly via its Src Homology 2 (SH2) domain. It has also been reported to negatively regulate *MPL* and erythropoietin receptor (EPOR) signaling.²⁰ Most of the *SH2B3* mutations are located in the SH2 and plextrin homology domains, and can be found with *JAK2V617F* in the same patient.²¹ *Sh2b3*^{-/-} mice present splenomegaly and extramedullary hematopoiesis, and a 3- to 5-fold increase in platelets.²² In human, *SH2B3* mutations have been reported in ET, PMF, and some pure erythrocytosis and are essentially hypomorphic mutations.

CBL Mutations

Casitas B-lineage lymphoma (c-CBL) is an E3 ubiquitin ligase. *CBL* mutations are extremely rare in MPN and are mainly associated with myelofibrosis with a poor prognosis.^{23,24} They might be secondary mutations occurring during disease progression to leukemia. *C-CBL* mutations are mainly missense, in the linker-RING finger domain region that is essential to the E3 ubiquitin ligase activity. Mutations are homozygous or heterozygous.

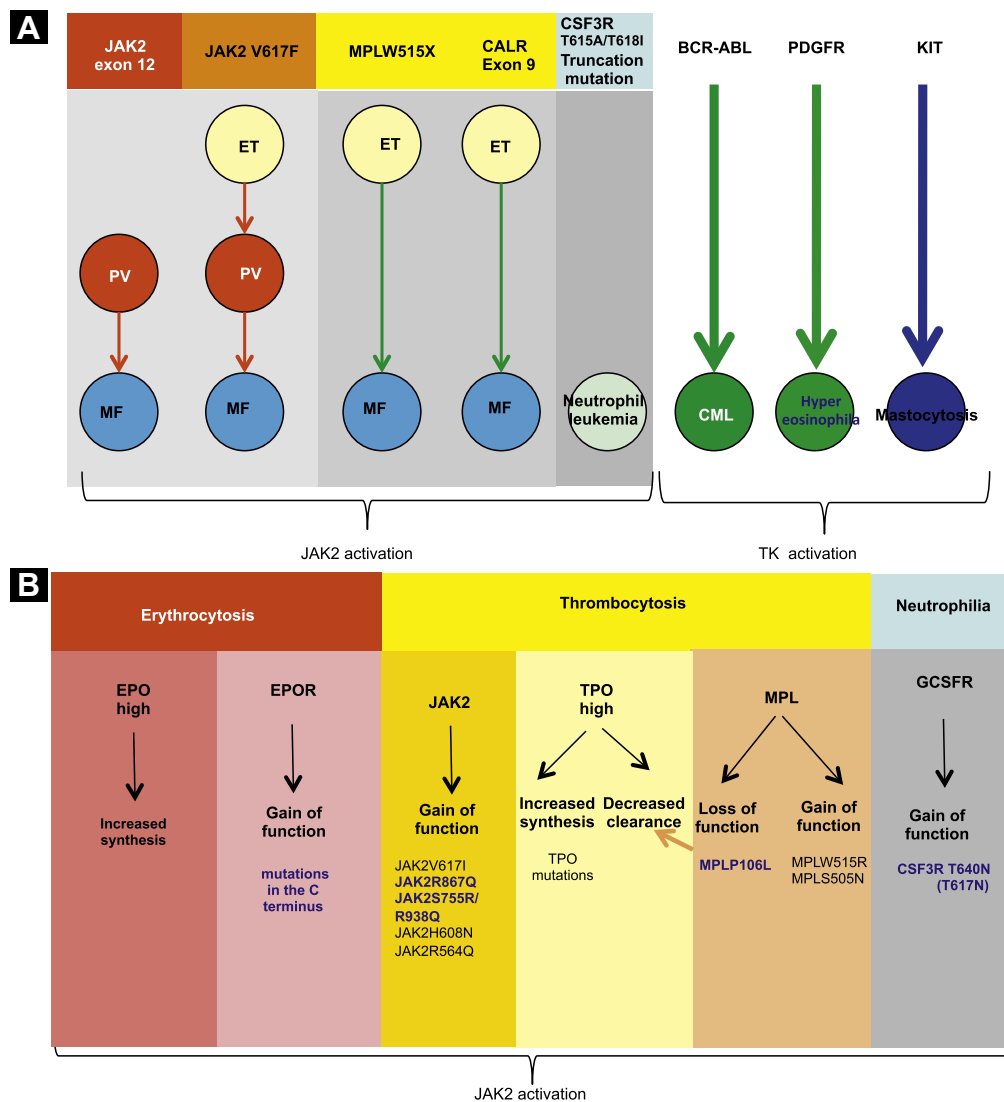
Coding Calreticulin Mutations

Recently, exome sequencing was performed in MPN patients negative for *JAK2V617F* and *MPL* mutations. Recurrent genetic abnormalities were found in exon 9 of the *CALR* gene.^{25,26} They are present in 60% to 84% of MPN samples with nonmutated *JAK2* and *MPL*: approximately 70% of ET and 56% to 88% of PMF but not usually in PV. It is also found in refractory anemia with ringed sideroblast with thrombocytosis (RARS-T) and very rarely in other myelodysplasia. A 52-base pair (bp) deletion (53%) and a 5-bp

insertion (32%) in exon 9 were found. In most cases, the *CALR* mutations were not associated with *JAK2V617F* and *MPL* mutations. All *CALR* mutations result in a + 1 bp-altered reading frame, a novel C-terminal peptide sequence lacking the KDEL C-terminal motif and multiple low affinity calcium-binding sites. The fact that all *CALR* mutations generate the same frame shift implies a strong selective pressure. The 52-bp deletion eliminates almost all negatively charged amino acids in the sequence encoded by exon 9, whereas the 5-bp insertion retains approximately half of the negatively charged amino acids, which could imply that the 2 mutant proteins have not exactly the same function.

The wild type *CALR* protein is present in the endoplasmic reticulum, where it is a key component of the quality control machinery that ensures proper glycoprotein folding and also contributes to calcium homeostasis.²⁷ Preliminary results are controversial concerning the localization of the mutated *CALR*, which lacks the KDEL motif involved in endoplasmic reticulum retrieval. Preliminary results in Ba/F3 cells expressing the 52-bp deletion showed cytokine-independent growth.²⁶ Moreover, the cytokine-independent proliferation of Ba/F3 cells expressing mutant *CALR* was suppressed with treatment with a *JAK2* kinase inhibitor. This result suggests that the *JAK/STAT* pathway is required for

Figure 1 Signaling Mutations in Sporadic MPN and Hereditary MPN-Like Forms. (A) Signaling Mutations Found in Sporadic Cases of MPN Correspond to *JAK2*, *MPL*, *CALR*, and *CSF3R* Mutations. All of These Mutants are Differentially Found in ET/PV or PMF. They All Confer *JAK2* Activation, and *BCR-ABL*, *X-PDGFR*, and *Kit* Mutants Lead to Tyrosine Kinase Activation. (B) Signaling Mutations Found in Hereditary MPN-Like Forms Corresponding to *EPO*, *EPOR*, *TPO*, *MPL*, *JAK2*, or *CSF3R* Mutations. They Similarly Induce *JAK2* Activation



Abbreviations: CML = Chronic Myeloid Leukemia; EPO = Erythropoietin; EPOR = Erythropoietin Receptor; ET = Essential Thrombocythemia; GCSFR = Granulocyte colony stimulating factor receptor; MF = myelofibrosis; MPL = myeloproliferative leukemia; PV = Polycythemia Vera; TK = Tyrosine Kinase; TPO = Thrombopoietin.

JAK2 and Myeloproliferative Neoplasms

cytokine-independent proliferation induced by the CALR mutant. An increased phosphorylation of STAT5 in the Ba/F3 cells expressing the 52-bp deletion was detected, consistent with this hypothesis. However, the precise mechanism by which the mutant protein activates the JAK/STAT pathway is presently unknown.

In summary, mutations activating the cytokine receptor/JAK2 pathway are present in most MPN, leading to different clinical disorders (Figure 1A and Figure 2). The *JAK2V617F* mutation is associated with erythroid and megakaryocyte phenotypes and thus is present in ET, PV, and PMF. *SH2B3* mutations also might be associated with these 3 disorders. Otherwise, the other mutations are more lineage-specific. *JAK2* exon 12 is associated with PV, which, however, can progress to myelofibrosis, and *MPL* and *CALR* mutations with ET and PMF and also with RARS-T and some thrombotic disorders (splanchnic thrombosis) as *JAK2V617F*. However, there is increasing evidence that *JAK2V617F* and *CALR* mutations define different disorders. Patients with *CALR*-positive ETs are at a lower risk of vascular events, and display a longer overall survival (OS) than those with a *JAK2* or *MPL* mutation, whereas no significant difference was observed between the 2 latter subgroups.^{28,29} In PMF, the clinical features and prognosis are more dependent on mutations in genes involved in other pathways. However, as in ET, it seems that MF associated with *CALR* mutations have a better prognosis than the others.

Another important difference between the *JAK2V617F* and the *CALR* mutations concerns the clonal dominance. Both mutations target hematopoietic stem cells (HSCs). However, the *JAK2V617F* clone is mainly amplified during late stages of differentiation.³⁰ This explains that the *JAK2V617F* allele burden can be extremely low in ET with the presence of a majority of normal cells. In contrast, in *CALR*-positive ET, the allele burden is approximately 50% in granulocytes, suggesting that the *CALR*-mutated clone has a profound advantage in early stages of hematopoiesis, including the HSC compartment. It is paradoxical that the *JAK2V617F* disease has a more severe phenotype than the *CALR* clone, which seems to be more effective for invading hematopoiesis. This suggests that *JAK2V617F* might have some specific properties on hematopoietic

cells such as induction of an inflammatory reaction or changes in the function of mature cells.

Presently, approximately 10% to 15% of PMF and ET do not display mutations in genes encoding signaling molecules and are called triple-negative. It is presently unknown if this group is still heterogeneous.

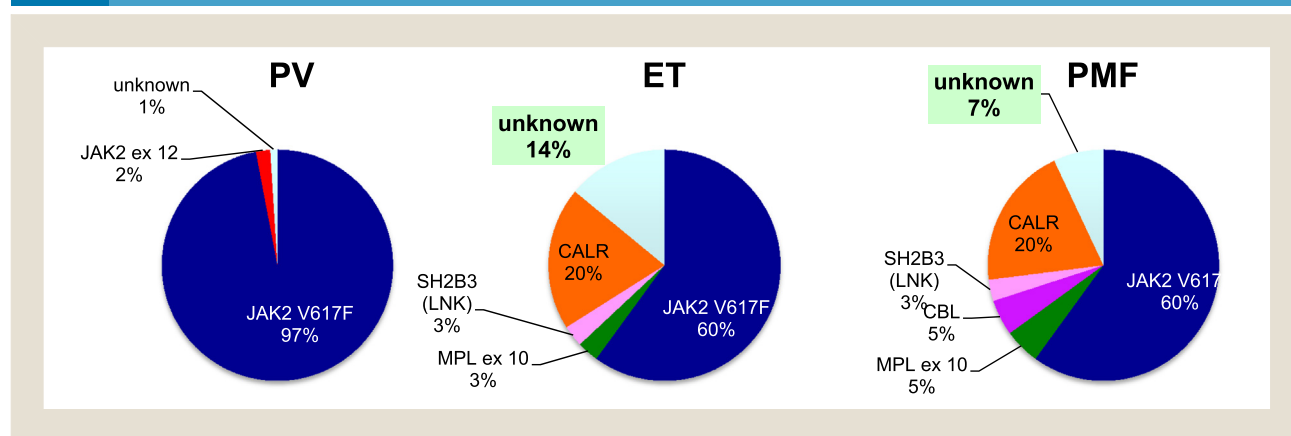
Hereditary Thrombocytosis, Neutrophilia, and Erythrocytosis Associate With an Increased Activation of the Cytokine Receptor/JAK2 Pathway

Several different germ line mutations inducing the activation of JAK2 by different mechanisms, have been discovered in “MPN-like” families (Figure 1B). The mutations target the same genes in MPN including *JAK2*, the cytokine receptors (*MPL*, *CSF3R* [Colony-Stimulating Factor 3 Receptor]) and genes regulating Erythropoietin (EPO) or TPO levels. In most cases, the affected signaling pathways result in an increase in platelets, red blood cells (RBCs), and neutrophils, like in MPN.

Familial erythrocytosis is characterized by an absolute increase of the RBC mass, with variable symptoms, ranging from a benign condition to severe thromboembolic complications.³¹ This hematological disorder can be primary due to an intrinsic defect of the EPO signaling pathways resulting in an increase in progenitor proliferation. Approximately 12% of primary familial erythrocytosis share *EPOR* gain-of-function mutations that lead to truncation of the receptor.³² To date, 18 different nonsense or frame shift *EPOR* mutations, all resulting in truncations of EPOR and the loss of the negative regulatory domain, especially the Src Homology Phosphatase (SHP)-1 docking site, have been described in familial erythrocytosis. The endocytosis and degradation of these truncated EPORs are strongly reduced.³³ Thus, decreased downregulation of EPOR and consequent increased JAK2 signaling leads to hypersensitivity of the erythroid progenitors to EPO and to the development of the erythrocytosis phenotype.

Secondary familial erythrocytosis usually displays alterations of the oxygen-sensing pathway (for example, mutations of Von-hippel Lindau [*VHL*] or Prolyl Hydroxylase Domain protein 2 [*PHD2*]) or an increase of EPO level (Hypoxia inducing Factor 2

Figure 2 Frequency of Signaling Mutations in MPN Cases. The Diagrams Represent the Frequency of *JAK2*, *MPL*, *SH2B3*, *CBL*, and *CALR* Mutations in PV, ET, and PMF



Abbreviations: ET = Essential Thrombocythemia; MPN = Myeloproliferative Neoplasms; PMF = Primary Myelofibrosis; PV = Polycythemia Vera.

(*HIF2a*) mutations, some high-oxygen-affinity hemoglobinopathies), resulting in enhanced signaling of EPOR/JAK2 pathways.

Hereditary thrombocytosis is characterized by an isolated thrombocytosis associated with an increased thromboembolic risk. In patients, disease can evolve to mild splenomegaly and bone marrow fibrosis without progressing to leukemia.³⁴ The germ line mutations that have been identified in familial thrombocytosis all affect genes involved in TPO/MPL signaling. They include *MPL* S505N and *MPL* W515R leading to the constitutive activation of the receptor and *MPL* P106L that decreases the level of expression of membrane MPL and increases TPO level.^{18,35,36}

Several mutations in the *TPO* gene leading to increased TPO translation, have also been described in families with a thrombocytosis.^{37,38} All of these mutations lead to inappropriate JAK2 activation through different mechanisms. Hereditary thrombocytosis is the only entity that exhibits germ line mutations of *JAK2*. The presence JAK2V617I is responsible for a thrombocytosis with a dominant pattern of inheritance with high penetrance. JAK2V617I-expressing cells display a weaker constitutive JAK2 activation than JAK2V617F, and hypersensitivity to cytokines.³⁹ The JAK2H608N is located in the pseudokinase domain (JAK homology [JH2]) of JAK2 and results in a cytokine-independent activation of JAK2 and STAT5, probably by impairing the negative regulatory function of the JH2 domain on the JH1 kinase domain.⁴⁰ JAK2R654Q, in the JH2 domain, also exhibits high phospho-JAK2 and phospho-STAT5 levels contributing to the increased cell survival.⁴¹ Finally, Marty et al described 2 families with novel germ line *JAK2* mutations: JAK2R876Q in the kinase domain and JAK2S755R/R938Q respectively located in the JH2 and JH1 domains. These gain of function mutations are dependent on MPL and are less sensitive to JAK2 and heat-shock protein (HSP)-90 inhibitors than JAK2V617F.⁴²

Familial chronic neutrophilia is an extremely rare hematological disorder. An autosomal dominant mutation of the *CSF3R* gene, coding for granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) receptor (G-CSFR), has been described in a single pedigree. G-CSF-activated G-CSFR induces proliferation and differentiation of neutrophils and mobilizes hematopoietic progenitors from bone marrow to peripheral blood. The CSF3RT617N (or T640N with signal peptide) favors the dimerization of G-CSFR, leading to the constitutive activation of the receptor and downstream signaling pathways, including JAK2.⁴³ Acquired gain of function mutations in *CSF3R*, predominantly *CSF3RT618I*, have been described in chronic neutrophil leukemia.⁴⁴

Overall, it is interesting to note that hereditary disorders are associated with mutations in the same genes as in MPN. For *MPL*, the amino acid substitution can be identical (*MPLS505N* or *MPLW515R*), but for *JAK2* and *CSF3R* they are different. In particular, *JAK2V617F* in contrast to *JAK2V617I* has not been detected in hereditary disorders. This suggests that germ line *JAK2V617F* might be lethal in human in contrast to in mouse or that *JAK2V617F* has very specific properties, which permit its selection during oncogenesis.

Presence of Mutations in Other Pathways in MPN

The mutations affecting the cytokine/cytokine receptor/JAK2 axis can be associated with other mutations involving either epigenetic

regulators or components of the spliceosome machinery. The mutations in signaling molecules are restricted to myeloproliferative disorders. In contrast, epigenetic and spliceosome mutations are found in other chronic and acute myeloid hemopathies, but also in some lymphoid hemopathies and occasionally in solid tumors. They can be primary events or acquired as secondary events associated with the progression of the disease, especially when evolving to leukemia. They are primarily found in myelofibrosis, supporting the idea that myelofibrosis is a fast-evolving type of MPN. Treatment of MPN should take into account the influence of these mutations in the disease appearance, phenotype, and progression. First, the number of mutations has to be determined because accumulation of mutations correlates with a poor prognosis. Second, it appears crucial to know whether “druggable” mutations arise first or as a secondary event. Third, the architecture of the clone should be investigated to characterize the structure of the clone as being linear or branched with eventually different mutated clones.

The most frequent mutations in epigenetic regulators in MPN are *TET2*, additional sex comb-like 1 (*ASXL1*) and DNA methyltransferase (*DNMT3A*). Isocitrate dehydrogenase (*IDH1/2*), and Enhancer of zeste homolog (*EZH2*) are also found in MPN, but they are rare. They could predate or arise on a *JAK2V617F* background. Moreover, they might cooperate with *JAK2V617F* to favor clonal dominance (*TET2* or *DNMT3A*), to modify disease phenotype or to promote either progression to myelofibrosis or leukemic transformation (*ASXL1*, *IDH1/2*, *EZH2*). *TET2* and *DNMT3A* mutations, 2 genes implicated in the regulation of DNA methylation more frequently predate *JAK2V617F* and can be found in ET, PV, and PMF. *IDH1/2* and *EZH2* usually postdate *JAK2V617F* and are associated with leukemic progression of the disorder.

TET2 presents a 2-oxoglutarate/Fe²⁺ oxygenase activity that converts 5 methylcytosine (5mC) in 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) and participates in active DNA demethylation.⁴⁵ *TET2* mutations are the most prevalent epigenetic regulators found in MPN (15%). More specifically, the *TET2* mutation was found in approximately 4% of ET, 10% to 16% of PV, and 8% to 15% of PMF.⁴⁶ They are loss of function mutations, more frequently on 1 allele, but mutations on a second allele can be observed during disease progression.⁴⁷ *TET2* plays a role in clonal dominance because in human primary cells and in mouse models its deficiency leads to the amplification of HSC and hematopoietic progenitors.^{46,48,49} Mutations in *TET2* and a clonal hematopoiesis have been identified in aged people presenting no sign of hemopathy.⁵⁰ Thus, one can speculate that *TET2* mutations might induce a clonal hematopoiesis and might synergize with *JAK2V617F* appearance to induce the development of a MPN. If *TET2* mutation postdates *JAK2V617F*, it might increase the penetrance of the *JAK2V617F*. Nevertheless, studies have failed to demonstrate evidence that *TET2* mutations correlate with any prognostic in patients with MPN.⁵¹

Isocitrate dehydrogenase-1/2 are enzymes that catalyze the oxidative decarboxylation of isocitrate, producing 2-oxoglutarate and CO₂. The mutants have neomorphic functions that lead to the production of 2-hydroxyglutarate that can inhibit the function of many 2-oxoglutarate dependent enzymes including the Ten-Eleven translocation (TET) family.⁵² Mutations in *IDH1/2* are primarily found in acute leukemia. They can be also found in MPN (2%) but are associated with evolution to secondary leukemia.⁵³

JAK2 and Myeloproliferative Neoplasms

DNMT3A is a member of the mammalian family of methyltransferase that adds a de novo methyl group to cytosine in CpG dinucleotides in DNA. *DNMT3A* mutations are found in approximately 9% of MPN and more especially in 5% to 7% of PV patients and 10% to 15% of PMF patients, but are more frequent in post-MPN acute myeloid leukemia (AML).⁵⁴ The main mutation targets the R882 residue and the others lead to a truncated protein. They are primarily heterozygous mutations. Moreover, the recent conditional mouse model exhibited an amplification of the HSC pool with impaired differentiation but did not develop a malignant phenotype,⁵⁵ suggesting that *DNMT3A* mutations contributed to clonal dominance, like *TET2* mutations. *DNMT3A* mutations correlate with a poor prognosis and a reduced survival in patients with AML,⁵⁶ however, no studies have been performed to demonstrate a prognostic role in patients with MPN.

Additional sex comb-like 1 is a nuclear polycomb protein that can act as an activator and as a repressor of transcription and is primarily involved in histone modification.⁵⁷ In mammalian hematopoietic cells, ASXL1 is associated with BRCA1-associated protein 1 (BAP1) in the polycomb repressive-deubiquitinase complex and deubiquitylates Histone 2A lysine 119 (H2AK119). However, ASXL1 also directly interacts with the Polycomb repressing complex 2 (PRC2) complex and controls the recruitment of EZH2.⁵⁸ This last function seems predominant in malignant hemopathies. Mutations in *ASXL1* are loss of function and are heterozygous, leading to *ASXL1* haploinsufficiency in patients.⁵⁹ Thus, ASXL1 behaves genetically as a tumor suppressor gene. Mutations are found in 8% of MPN cases and affect 7% to 17% of patients with PMF whereas it is much lower in PV (2% to 5%) and ET (5% to 8%).⁶⁰ However, the frequency of *ASXL1* mutations are extremely different among the different studies. This might be related to technical problems because the most frequent genetic alteration (insertion of a guanine nucleotide at position 1934, c.1934dupG) is difficult to sequence, particularly using next-generation sequencing. *ASXL1* mutations are associated with a poor outcome and progression to leukemia,⁶⁰ and might also modify the phenotype of the disease because *Asxl1* knockout mice exhibited in addition to many developmental defects, a myelodysplastic disease.⁶¹

In the same pathway, *EZH2* was found mutated in patients with MPN (3%).^{62,63} Mutations in *EZH2* were more frequent in MPN patients with PMF or post-PV/ET MF and less frequent in ET and PV, indicating a potential role in fibrotic transformation,⁶² and are primarily found as postdating *JAK2V617F*. They are associated with a poor prognosis in PMF.⁶⁴ They appeared to be loss of function mutations,⁶³ but the exact role in MPN disease is not well understood. Nevertheless, conditional *Ezh2* knockout mice recapitulate an MDS/MPN disease,⁶⁵ suggesting a direct role in disease development. Interestingly *TET2* and *EZH2* deletion might cooperate to induce an accelerated myelodysplastic disease and *EZH2* mutations appear to induce different outcomes than *ASXL1* mutations although they both promote the same epigenetic modification.⁶⁵

Other mutations have also been found in the chronic phase of MPN. Through a whole-exome sequencing of a cohort of MDS, Yoshida and colleague described a number of splicing mutations.⁶⁶ Three of them, Splicing Factor 3B subunit 1 (*SF3B1*), Serine/arginine-rich Splicing Factor 2 (*SRSF2*), and U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 (*U2AF1*), are more represented in MPN, particularly in MF.²⁵

SF3B1 is a subunit of the SF3B complex and is found in 2% of MPN cases. *SF3B1* mutations are linked essentially with Refractory Anemia with Ringed Sideroblast (RARS).⁶⁶ In Refractory Anemia with Ringed Sideroblast with Thrombocytosis (RARS-T), *SF3B1* is associated with *JAK2V617F* and rarely with *MPL* and *CALR* mutations. Besides RARS-T, *SF3B1* mutations are rare in MPN (approximately 6.5% in MF) and are associated with the presence of sideroblasts.

SRSF2 is a member of the SR family of RNA-binding proteins. *SRSF2* is found mutated in 2% of MPN²⁵ and approximately 17% of MF. Its depletion causes the accumulation of DNA damage, genomic instability, and induction of G2-M cell-cycle arrest. Mutations of *SRSF2* are mainly heterozygous and are frequently missense mutations on the P95 residue. They cluster with *IDH1/IDH2* mutations in MF and less with *TET2* or *ASXL1* compared with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). Even in the absence of *IDH* mutations, they are associated with increased transformation of the MPN disease.⁶⁷ *SRSF2* mutations might occur early in the disorder.

U2AF1 is a small nuclear RNA auxiliary factor 1 that belongs to the splicing factor SR family of genes. It is identified in 3% of MPN cases and 16% in MF.⁶⁸ They are heterozygous missense mutations predominating on the Q157 residue and are strongly associated with profound anemia and thrombocytopenia despite some link with *JAK2V617F*.⁶⁸

Other mutations in the spliceosome pathway including *ZRSF2* and in cohesin genes are very rare in MPN.

Some other genetic alterations are especially associated with leukemic transformation, particularly Runt-related transcription factor (*RUNX1*) mutations and deletion in chromosome 7 involving *IKAROS* and Homeobox protein cut-like 1 (*CUX1*).⁶⁹ However, the most important mutations in the transformation concern the *P53* (tumor suppressor).⁷⁰ They are observed in most MPN-derived leukemias whereas they are rare in sporadic leukemia. Mutations on one allele can be observed during the chronic phase and transformation is associated with mutations on the second allele.^{71,72}

Altogether, with the exception of *TET2*, *DNMT3A*, and to a lesser extent *ASXL1*, these mutations are rare outside MF, which, on the mutation point of view is close to MDS and CMML. Several mutations can be present together and the mutations in epigenetic regulators are not mutually exclusive. Mutations in different genes involved in the spliceosome machinery and signaling molecules are sometimes in different subclones. These different combinations of mutations in MF explain the heterogeneous phenotype of this disorder and the differences in prognosis. Outside *CALR* mutations, *ASXL1* mutations appear to be the most important biomarker for prognosis because its prognostic value is independent of the clinicobiological classification and *P53* mutations for progression to leukemia.

New Therapies Aiming to Target the JAK/STAT Pathway and Downstream Molecules

The success of small-molecule tyrosine kinase inhibitors targeting BCR-ABL fusion in Chronic myeloid leukemia (CML) has led to the development of related drugs targeting kinases involved in other malignancies. All evidence that in non-BCR-ABL MPN JAK2

constitutive activation through direct mutations or indirectly through other mutations was the key event in the development of the myeloproliferation. This has led to the development of JAK2 inhibitors. However, compared with Abelson (ABL), JAK2 is a quite different target because it is indispensable for hematopoiesis, particularly for red blood cell and platelet production. Therefore, it is not possible to strongly inhibit wild type JAK2 without inducing an anemia or a thrombocytopenia and presently no inhibitor is specific for JAK2V617F. Because of these limits, other attempts have been done either to indirectly target JAK2V617F or downstream molecules of the pathway to obtain some “synthetic lethality” or to target effectors, which might be important for clonal development. In addition, interferon alpha (IFN α) is one of the rare molecules that targets the JAK2V617F clone, but the precise mechanism remains unknown.

Specificity and Resistance to Type I and II JAK2 Inhibitors

Several JAK kinase inhibitors are presently used in clinical trials. All of them are Adenosine Tri-Phosphate (ATP) mimetic type I JAK inhibitors binding to the active conformation of the kinase with different target profiles.⁷³ Initial clinical trials focused on intermediate- and high-risk MF because of the important therapeutic need. Yet, these molecules have shown little clinical efficacy and no real survival improvement.

The Different JAK Inhibitors

Ruxolitinib (INCB018424, Jakafi, Jakavi), is a JAK2/JAK1 inhibitor and the only one approved by the U.S. Food and Drug Administration in 2011 and the European Commission in 2012, based on the results of 2 pivotal phase III trials, COMFORT (CONtrolled MyeloFibrosis study with ORal JAK inhibitor Treatment) -I and -II. These 2 randomized trials studied ruxolitinib versus placebo (COMFORT-I) or best available treatment (COMFORT-II) in patients with intermediate 2, high-risk primary, or post-PV/ET MF. Whatever the JAK2 status, ruxolitinib therapy led to a rapid and sustained reduction of the spleen size (average of 30%), a sustained reduction of myelofibrosis-related symptoms, and an improved quality of life in most patients.^{74,75} It appears that the clinical improvement is due to the decreased level of proinflammatory cytokines, rather than to the minor decrease of JAK2V617F allele burden.^{74,75} Survival analysis showed an advantage for patients who received ruxolitinib in the COMFORT-I study after a median follow-up of 51 months, and only the analysis of an extension phase of COMFORT-II suggested a longer OS in the ruxolitinib arm. It has to be noted that the design of this trial was not fitted for survival analysis. The survival analysis of 2 cohorts of patients with intermediate 2 or high-risk MF, treated with ruxolitinib was performed in a phase I/II study at the M.D. Anderson Cancer Center (MDACC). Indeed, there was an OS improvement for high-risk MF patients treated with ruxolitinib in the MDACC trial,⁷⁶ and no survival advantage was observed by the Mayo Clinic group.⁷⁷ Generally well tolerated, the major limiting toxicity of ruxolitinib is myelosuppression.^{74,75} However, an interim analysis of an ongoing phase II trial for MF patients with platelet counts ≥ 50 to $100 \times 10^9/L$ showed that starting with lower dose of ruxolitinib with subsequent dose optimization can provide a spleen volume reduction with a good tolerance.⁷⁸ In PV, a phase II study

for patients refractory or intolerant to hydroxyurea showed efficacy of ruxolitinib with a decrease of hematocrit without phlebotomy in 97% of patients and with a good tolerance.⁷⁹ Two ongoing phase III trials will further characterize the effect of ruxolitinib for PV.

SAR302503 (TG101348, fedratinib; Sanofi) is a JAK inhibitor, targeting preferentially JAK2. This drug seemed promising by improving MF-related symptoms and reducing spleen size and JAK2V617F allele burden. However, its development has been stopped because of appearance of Gayet-Wernicke encephalopathy in some cases.

CEP701 (lestaurtinib; Cephalon) is a multikinase inhibitor initially used in a trial for AML based on its anti-Fms-Like tyrosine kinase 3 (FLT3) activity. In a phase II study, it showed a modest effect in reducing splenomegaly, MF-related symptoms, and leukocytosis, and had no effect on JAK2V617F allele burden or proinflammatory cytokine levels.⁸⁰ In a phase I/II trial, patients with PV or ET experienced a reduction of spleen volume but no decrease of thromboembolic events.⁸¹

CYT387 (Gilead Sciences) inhibits JAK1 and JAK2 equally well. In a phase I/II trial, it exerted a reduction of spleen size, anemia, and MF-related symptoms in almost 50% of patients. Fifty-eight percent of transfusion-dependent patients became transfusion-independent. Interestingly, responses were also observed in patients in whom ruxolitinib or SAR302503 treatment had failed.⁸² A phase III trial of CYT387 in MF is actually ongoing.

SB1518 (pacritinib; SBio) is a pyrimidine-based JAK inhibitor with a preferential efficacy against JAK2. In a phase II trial, pacritinib showed efficacy for reduction of spleen size and general symptoms with a low frequency of myelosuppression.⁸³ This JAK inhibitor could therefore be of interest for MF patients with impaired hematopoiesis. A phase III trial is ongoing.

Other JAK inhibitors (LY2784544, NS018, AZD1480, BMS911543, tasocitinib, NVP-BSK805, INCB16562) are in pre-clinical or clinical investigations and results of these studies are pending.

Limitations and Perspectives

Despite interesting results in MF, JAK inhibitors have some limitations. First of all, compared with the dramatic effect of tyrosine kinase inhibitors in CML, JAK inhibitors have shown a modest reduction of allele burden or fibrosis. Moreover, results in a mouse model suggest that JAK inhibitors are not able to reduce the number of MPN-initiating cells.⁸⁴ Therefore, these molecules cannot be considered as curative and will require continuous therapy to maintain the response. However, JAK inhibitors could provide benefit to MF patients before allogeneic HSC transplantation, which remains their only curative option, by facilitating engraftment and hematological recovery, as observed in a German trial. These promising results have to be confirmed because of the small size of the cohort and the short follow-up.⁸⁵

Another limitation is the rapid relapse of symptoms after treatment discontinuation described with ruxolitinib, serious enough to require hospitalization of 11% of patients. Gradual tapering and/or use of corticosteroids could be useful in those cases.⁸⁶ However, no severe adverse events were seen after ruxolitinib discontinuation in the COMFORT trials.^{74,75}

JAK2 and Myeloproliferative Neoplasms

The third limitation is the hematopoietic toxicity of JAK inhibitors. Safety and efficacy in patients with platelets $< 50 \times 10^9/L$ and/or transfusion-dependent anemia is not known, and this category of patients particularly needs new therapeutic options. In a phase I/II study, use of CYT387 reduced the anemia in most patients.⁸²

Secondary resistance is a major obstacle in the treatment of cancers with kinase inhibitors. Several mutations of the kinase domain of JAK2 have been identified in *in vitro* studies, but not in *in vivo* studies. Most of them are likely to alter the inhibitor binding and cross-resistance that has been observed.^{87,88} A gatekeeper mutation (*JAK2M929I*) was also observed with ruxolitinib, conferring a modest resistance to this drug.⁸⁷ Moreover, chronic exposure to JAK inhibitors leads to the development of persistent cells in which JAK2 is activated via the formation of heterodimers with other JAKs, able to transphosphorylate JAK2.⁸⁹ These cells remain sensitive to JAK2, the use of type 2 inhibitors, which target and stabilize the inactive form of the kinase, could overcome this phenomenon, but none of these drugs are actually being used in a clinical trial.⁹⁰ Another option is the association of type 1 inhibitors with treatment leading to JAK2 degradation like HSP90 inhibitors or histone deacetylase (HDAC) inhibitors.

JAK2V617F-Specific Inhibitors Targeting F595

An alternative approach could be to develop specific JAK2V617F allosteric inhibitors targeting the phenylalanine 595 residue. Using a functional mutagenesis strategy, it was shown that the F595 residue is located in the middle of the alpha C helix of JH2 necessary for JAK2V617F activity.⁹¹ Therefore, the model was to postulate that F595 and F617 interact, which might affect orientation of the JH2 helix- α C and thereby might lead to modulation of JH1 activity. This interaction has been visualized in the recent x-ray crystal structure of the JH2 and JH2 V617F domains by the Hubbard group: the presence of the V617F mutation extended and stabilized helix C, which activates JH1.⁹²

Indirect Targeting of JAK2

Heat-Shock Protein-90 Inhibitors

Heat-shock protein-90 is a member of the HSP family protein that is ubiquitously expressed in mammals. HSP proteins act on the correct folding, the intracellular disposition, and the proteolytic turnover of key regulators of cell growth and survival. HSP90 displays a folding and a chaperoning activity, especially on signal transducer molecules such as BCR-ABL, FLT3, and JAK2.⁹³ HSP90 exists as a homodimer and each of the monomers contains 3 main domains. First, the N-terminal part contains an unusual adenosine nucleotide-binding pocket displaying the chaperoning activity, the middle part plays an important role in modulating ATP hydrolysis through the binding of gamma-phosphate and is important for binding client protein, and the C-terminal part of the protein is mainly involved in dimerization. Therefore, ATP-competitive inhibitors were developed including the benzoquinone ansamycin 17-AAG and its derivatives. However because of high nonhematopoietic toxicity, other nonansamycin inhibitors such as PU-H71, SNX5422, and NVP-AUY922 were further developed.⁹⁴ In fact, the basis of the use of these types of inhibitors was to destabilize JAK2 protein and to induce its proteolytic degradation. Therefore, various studies have tested the

effect of HSP90 inhibitors alone or in combination with JAK2 inhibitors, first in cellular models, then in preclinical and clinical trials. Initial studies have shown that PU-H71 treatment induced a decrease in JAK2 protein and its downstream signaling led to a subsequent inhibition of cell growth of *JAK2V617F*- or *MPLW515L*-positive cell lines and *JAK2V617F*-positive primary MPN cells. Moreover, in *JAK2V617F* and *MPLW515L* retroviral mouse models, this compound also strongly reduced the severity of the disease and specifically eradicated the malignant clone.⁹³ A combination of PU-H71 and TG101348 JAK2 inhibitors led to an additive antiproliferative effect in cell lines. These results were also confirmed with another HSP90 inhibitor NVP-AUY922 alone or in combination with JAK2 inhibitors in primary MPN cells and in cell lines.⁹⁵ Moreover, it was even shown in cell lines that HSP90 inhibitors could overcome the resistance to the TG101348 JAK2 inhibitor.

Histone Deacetylase Inhibitors

Heat-shock protein-90 is posttranslationally regulated by a mechanism of acetylation/deacetylation of its lysine residues, with acetylation leading to its degradation. These modifications are regulated by histone acetyltransferases and HDACs. Therefore, inhibitors of HDACs have been tested to evaluate the role HSP90 acetylation in MPN development. It is not known whether the efficacy of these HDAC inhibitors plays a role via histone or nonhistone acetylation. Several inhibitors of HDAC currently exist, such as givinostat (ITF235), panabinstat (LBH589), vorinostat (MK-0683), Pracinostat (SB939), and abexinostat. In a pilot study, it was shown that givinostat induced a decreased in JAK2 protein level and its signaling pathways and growth inhibition in *JAK2V617F*-positive cell lines and primary MPN cells.⁹⁶ Similar results were found with the pan-HDAC inhibitor panabinstat and further efficacy was found in combination with the TG101348 JAK2 inhibitor.⁹⁷ Using a mouse preclinical model, a combination of ruxolitinib JAK1/2 inhibitors and panabinstat was fairly well tolerated and resulted in improved efficacy of *JAK2V617F*-driven disease compared with the single agents.⁹⁸ Clinical trials have been done in PMF and post-PV/ET MF. A phase I study with panabinstat in 18 MF patients showed that it was well tolerated and active regardless of *JAK2V617F* status with clinical improvement and sometimes spleen reduction.⁹⁹ In contrast, in 1 phase II study with panabinstat in MF, it was shown that it was poorly tolerated with adverse effects such as thrombocytopenia and diarrhea and with only slight activity on clinical parameters.¹⁰⁰ Panabinstat is currently used in phase I clinical trials in combination with ruxolitinib. To improve the efficacy of this strategy, it will be interesting to use more specific HDAC inhibitors such as HDAC6 inhibitors because HDAC6 activity and expression increased in MPN cells¹⁰¹ and it was shown that HDAC6 could regulate HSP90 acetylation.¹⁰²

Inhibitors of Signaling Molecules Downstream of the Cytokine Receptor

After cytokine binding to the receptor, JAK2 is autophosphorylated and induces the transphosphorylation of receptors such as EPOR, MPL, or G-CSFR. This leads to the activation of downstream signaling pathways including STAT1, 3, 5, PI3K, and

MAPK/ERK. Therefore, a strategy has evaluated the effect of inhibitors of these 3 types of signaling molecules on the basis of the greater activation of these pathways by *JAK2V617F* mutation compared with JAK2 wild type (Figure 3).

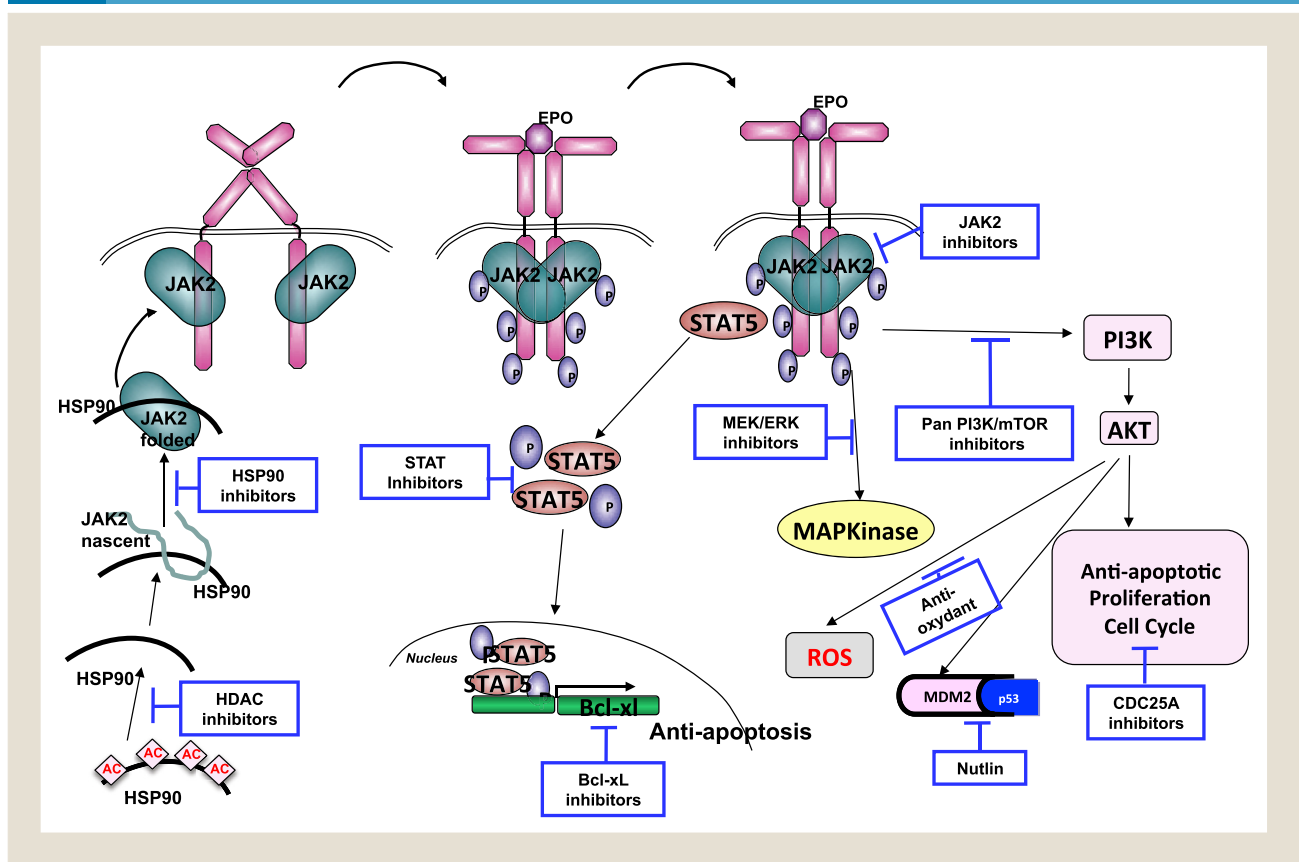
STAT5 has a major effect in *JAK2V617F*-mediated signaling pathways for 2 reasons: (1) deletion of STAT5 in a *Jak2V617F* knock-in mouse model abolished PV development¹²; and (2) a constitutive active form of STAT5 in erythroid progenitors led to spontaneous growth and erythroid endogenous colony (EEC) formation.¹⁰³ Pimozide was the first described STAT5 inhibitor that was tested with efficacy in vitro in cell lines and in CD34-positive progenitor cells from CML and AML.¹⁰⁴ Recent studies have also shown a decreased viability with pimozide in HEL cell lines which was further enhanced by combination with JAK2 inhibitor.¹⁰⁵

The MAPK/ERK pathway is also interesting to target because it is involved in proliferation that could drive the malignant clone. In retroviral bone marrow transplant models in mice, it was shown that MPLW515A induces myelofibrosis via a cytosolic phosphorylated tyrosine which couples to MAPK/ERK and STAT3, and that these latter molecules were activated at high levels in Ba/F3 cells expressing MPLW515A.¹⁰⁶ It is therefore possible that MAPK/ERK and STAT3 promote myelofibrosis, and

that STAT5 and PI3K promote ligand-independent survival and proliferation.

The PI3K/AKT/mTOR pathway is also important to target because it is involved in antiapoptotic and prosurvival effects and proliferation and cell cycle. Several pan or more specific PI3K inhibitors have been developed and tested in vitro and in clinical trials. Choong et al have recently shown that pan-class I, but not gamma- or delta-specific PI3K inhibitors, synergized with JAK2 inhibitors. Ruxolitinib and GDC0941 strongly decreased *JAK2V617F*-driven tumor formation in nude mice and also inhibited EEC formation in MPN patients.¹⁰⁷ AKT allosteric inhibitors such as MK-2206 could also be interesting to use because a study has shown a decreased growth and a synergistic effect in combination with ruxolitinib in a *Jak2V617F* knock-in mouse model, cellular models, and primary MPN cells.¹⁰⁸ As a PI3K target, mTOR was also targeted by allosteric (RAD001) or ATP-competitive (PP242) inhibitors. The investigation led to a good efficacy in cell lines and in MPN primary cells.¹⁰⁹ A dual PI3K/mTOR inhibitor, BEZ235, also showed a synergistic effect in combination with ruxolitinib.¹¹⁰ Moreover, clinical phase I/II trials have concluded to a safety and efficacy of the everolimus mTOR inhibitor, in the MF.¹¹¹

Figure 3 Potential Druggable Targets in MPN. After Cytokine Binding to the Receptor, JAK2 Is Autophosphorylated and Induces the Transphosphorylation of Receptors Such as EPOR, MPL or G-CSFR. This Leads to the Activation of Downstream Signaling Pathways Including STAT 1, 3, 5, PI3K and MAPK/ERK. Therefore, a Strategy has Consisted of Evaluating Inhibitors of These 3 Types of Signaling Molecules and Inhibitors of Their Effectors or Inhibitors of Protein That Control Their Stabilities



Abbreviations: AC = Acetylation; CDC25A = Cell division cycle; EPOR = Erythropoietin Receptor; HDAC = Histone Deacetylase; HSP90 = Heat-Shock Protein-90; MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinase; MDM2 = Mouse double minute 2; MEK = mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase; MPN = Myeloproliferative Neoplasms; mTOR = Mammalian Target of Rapamycin; P = Phosphorylation; PI3K = Phosphoinositide 3-Kinase; ROS = Radical Oxygen Species; STAT = Signal transducer and activator of transcription.

JAK2 and Myeloproliferative Neoplasms

Finally, the PI3K/AKT/mTOR pathway was also shown to control the Mouse double minute 2 (MDM2)/P53 axis by upregulating MDM2 and downmodulating p53 function in cell lines and primary MPN cells. The use of the p53/MDM2 antagonist, nutlin, has inhibited the spontaneous growth of cell lines overexpressing JAK2V617F.¹¹² The P53 pathway was shown to be a key player of JAK2V617F-driven proliferation because nutlin was able to specifically synergize with IFN α to eradicate the malignant clone in cells from PV patients.¹¹³

Targeting the Specific Effectors of JAK2:

Bcl-xL/CDC25A/PIM1

Another way to target the JAK2 pathway is to act on the effectors of STAT5/PI3K/MAPK molecules. One way could be to inhibit Bcl-xL, which is a target of the STAT5 transcription factor and is a key player in the induction of spontaneous growth in human erythroid cells.¹⁰³ Treatment with the Bcl-xL inhibitor ABT-737 in combination with IFN α specifically eradicated JAK2V617F-positive PV progenitor cells.¹¹⁴ In murine models of JAK2-driven acute lymphoblastoid leukemia (ALL), the combination of a JAK2 inhibitor with ABT-737 has been efficient to induce prolonged disease regression.¹¹⁵ Another way to trigger the malignant clone could be to modify the cell cycle. In fact, JAK2V617F was shown to specifically increase cell division cycle (CDC)25A phosphatase, a key regulator of the G1/S cell cycle transition and inhibition of CDC25 led to a strong reduction in JAK2V617F cell lines and progenitor cells from MPN.¹¹⁶ Alternatively, another candidate might be the PIM1 kinase because it is activated by JAK2V617F and is involved in cell cycle progression.¹¹⁷

Radical Oxygen Species and Antioxidant Treatments

The role of radical oxygen species (ROS) has been highlighted by different studies in JAK2V617F-positive cells. First, there was an increase in ROS in Ba/F3 cells overexpressing JAK2V617F that correlated with an increase in cell proliferation by promoting the G1/S transition.¹¹⁸ Second, an augmentation in ROS levels was also observed in *BCR-ABL*-positive primary cells from patients, but also on some primary cells from PV patient. The Rac2 GTPase was shown to be responsible for the ROS increase through the stimulation of the mitochondrial respiratory chain complex III.¹¹⁹ This increase resulted in DNA double-strand breaks and in genomic instability. Third, a recent study also confirmed a ROS increase in Ba/F3 overexpressing JAK2V617F cell lines, in JAK2V617F-positive primary cells from patients including PV and MF and also in the progenitor compartment in a *Jak2V617F* knock-in mouse model. This increase was in part because of a lack of detoxification through an AKT-induced decrease in catalase expression and was accompanied by an increased amount of DNA damage such as 8-oxo-guanines and DNA double-strand breaks. The implication of ROS in the development of the disease was revealed by the effect of a ROS scavenger agent, the N-acetylcysteine (NAC). Competitive mice engrafted with 30% of *Jak2V617F* knock-in bone marrow cells developed a PV-like disorder.⁷ Treatment with NAC substantially restored blood parameters and reduced damage to DNA. Furthermore, NAC induced a marked decrease in splenomegaly with a reduction in the frequency of the JAK2V617F-positive hematopoietic progenitors in bone marrow

and spleen.¹²⁰ Finally, a ROS increase was also observed in neutrophils through the phosphorylation of the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) oxidase subunit, p47phox.¹²¹

Altogether, overproduction of ROS is a mediator of JAK2V617F-induced DNA damage that promotes disease progression. Therefore, targeting ROS accumulation might prevent the development of JAK2V617F MPN.

Interferon- α

Interferon- α has been used for more than 20 years to treat MPN patients and more specifically PV patients. It has been shown to control efficiently not only thrombocytosis and erythrocytosis, but also hematopoiesis by restoring a polyclonal state.^{122,123} Previous studies have shown that most patients treated with IFN α displayed a partial or complete hematological response associated with a molecular response by decreasing the JAK2V617F allelic burden. In addition, some patients achieved a long-lasting complete molecular remission even after treatment arrest.¹²² However, approximately a third of MPN patients do not respond to IFN α and a complete molecular response is observed in only approximately 20% of patients. In contrast to JAK2 inhibitors, IFN α targets specifically JAK2V617F HSCs and seems more efficient on the homozygous than on the heterozygous JAK2V617F subclones. In mice, 2 teams have developed a transplanted knock in/wild type (KI/WT) chimeric mouse model to mimic the human disease. In this model, IFN α treatment rapidly corrected hematological values, prevented spreading of neoplastic JAK2V617F cells to the benefit of normal cells, and suppressed disease-initiating cells, as demonstrated in retransplantation studies. These results showed that IFN α treatment preferentially suppresses the JAK2V617F HSC proliferative advantage. Therefore, this model reproduces hematological and molecular remissions obtained in some MPN patients and gives the opportunity to decipher the mechanism of action of this drug.^{7,124} In the human setting, monitoring of JAK2V617F clones has shown that IFN α primarily targeted homozygous JAK2V617F clones compared with heterozygous clones and that homozygous clones were the first to relapse after treatment cessation.³⁰ In vitro results have also shown that IFN α preferentially targets JAK2V617F-positive progenitors with a greater sensitivity on homozygous than heterozygous progenitors.¹²⁵ All of these results strongly suggest that the level of JAK2 signaling determines the level of the IFN α response. The role of associated mutations in the resistance to IFN α remains controversial because in 1 study failures correlated with additional mutations observed more frequently in non-responding patients.¹²⁶ Several hypotheses could be addressed to explain the preferential targeting of JAK2V617F HSCs by IFN α . First, IFN α induces the cell cycle of a subset of quiescent HSCs,¹²⁷ and thus IFN α might synergistically act with JAK2V617F to induce the cell cycle of these quiescent HSCs, which are at the origin of the disease leading to their loss of self-renewal capacities and JAK2V617F HSC exhaustion.¹²⁴ Second, IFN α could induce the expression of negative regulators of JAK2 signaling such as Suppressor of cytokine signaling (SOCS1) via the activation of STAT1/2 transcriptional factors. It is therefore possible that SOCS induction by IFN α blunted JAK2V617F constitutive activation, as it does for MPL signaling,⁹⁷ and STAT5 induced self-renewal leading to MPN HSC eradication. Alternatively, IFN α might

also suppress MPN cells through MAPK pathway activation. Inhibition of p38 (by the SB203580 compound)¹²⁵ or its downstream MAPK-interacting kinase 1 (Mnk1) effector (by small inhibitors and siRNA)¹²⁸ reversed growth inhibition and apoptosis of PV progenitor cells induced by IFN α . Finally, it cannot be totally excluded that this effect might be due to immunomodulation or an effect on the microenvironment.

In this context, additional mutations might play an important role either by modifying HSC biology including signaling and by blunting the response to IFN α . Future detailed studies of the mechanisms of action of IFN α might be important to develop new therapeutic approaches targeting JAK2 signaling in HSC.

However, it remains clear that targeting the JAK/STAT pathway in MF, diseases genetically more intricate than previously thought, might not be sufficient. In addition, in PV and ET, it remains controversial as to whether a single mutation in signaling molecule is sufficient to develop a disease. There is evidence, particularly in aged people that mutations such as *TET2* could appear before the signaling mutations and induce by themselves a clonal hematopoiesis.⁵⁰ Therefore, even by specifically targeting the *JAK2V617F* clone in some PVs and ETs might lead to the cure of the myeloproliferative disorder, but with the persistence of a clonal hematopoiesis, which can be considered as a preleukemic state. A proof of concept for this hypothesis has been afforded in a patient with a *TET2* mutation predating *JAK2V617F*, in whom IFN α completely reduced the *JAK2V617F* allele burden, but did not modify the level of the *TET2* mutation, even after a long follow-up.¹²⁹ In myelofibrosis with a more complex genetic background and in some way closer to MDS than MPN, targeting only signaling molecules might lead to the selection of subclones, resistant to therapy, and to profound changes in the phenotype of the disorder. Therefore, the order of appearance of the mutation and the clonal architecture might be an important determinant for treatment decision.

One can hypothesize that a combination of DNA demethylating agent such 5-azacytidine with an anti-JAK2 inhibitor or IFN α should be considered. Because histones can be methylated on arginine and lysine residues, and the position and extent of methylation determine whether the mark stimulates or represses transcription, it will be possible to combine histone demethylase inhibitors with an anti-JAK2 inhibitor.¹³⁰ Alternatively, because histones can also be methylated by proteins such as Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), that are specifically impaired by *JAK2V617F*,¹³¹ the use of an inhibitor of PRMT5 arginine methyltransferase might also be tested.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from Institut National de la Santé et de la recherche Médicale, Association nationale de la Recherche (ANR) Blanc (Thrombocytosis) and Jeunes chercheurs Jeunes Chercheuses (JCJC) ANR-13-JVSV1-Germprn-01 (GERMPN). L.S. was supported by grants from the DIM Stem pole, F.P. by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) foundation, and X.C. from Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de Technologie (MENRT). The authors thank Caroline Marty and Stefan Constantinescu for their critical reading of a draft of this report.

Disclosure

The authors have stated that they have no conflicts of interest.

References

- Spivak JL. The chronic myeloproliferative disorders: clonality and clinical heterogeneity. *Semin Hematol* 2004; 41:1-5.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365:1054-61.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434:1144-8.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352:1779-90.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7:387-97.
- Akada H, Yan D, Zou H, et al. Conditional expression of heterozygous or homozygous *Jak2V617F* from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood* 2010; 115:3589-97.
- 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 IFN α . *Blood* 2013; 122:1464-77.
- Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, et al. *JAK2V617F* expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006; 108:1652-60.
- 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; 111:3931-40.
- Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, et al. Progenitors homozygous for the *V617F* mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006; 108:2435-7.
- Chen E, Beer PA, Godfrey AL, et al. Distinct clinical phenotypes associated with *JAK2V617F* reflect differential *STAT1* signaling. *Cancer Cell* 2010; 18:524-35.
- Yan D, Hutchison RE, Mohi G. Critical requirement for *Stat5* in a mouse model of polycythemia vera. *Blood* 2012; 119:3539-49.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. *JAK2* exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356:459-68.
- Villevall JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, et al. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood* 1997; 90:4369-83.
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. *MPLW515L* is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3:e270.
- Staerk J, Lacout C, Sato T, et al. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood* 2006; 107:1864-71.
- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. *MPL515* mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108:3472-6.
- Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the *c-MPL* gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 2004; 103:4198-200.
- Oh ST, Simonds EF, Jones C, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein *LNK* drive *JAK-STAT* signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010; 116:988-92.
- Tong W, Zhang J, Lodish HF. *Lnk* inhibits erythropoiesis and Epo-dependent *JAK2* activation and downstream signaling pathways. *Blood* 2005; 105:4604-12.
- Pardanani A, Lasho T, Finke C, et al. *LNK* mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with *TET2*, *IDH*, *JAK2* or *MPL* mutations. *Leukemia* 2010; 24:1713-8.
- Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in *Lnk*-deficient mice. *J Exp Med* 2002; 195:1599-611.
- Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, et al. Frequent *CBL* mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 113:6182-92.
- Schwaab J, Ernst T, Erben P, et al. Activating *CBL* mutations are associated with a distinct MDS/MPN phenotype. *Ann Hematol* 2012; 91:1713-20.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med* 2013; 369:2391-405.
- Klampff T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013; 369:2379-90.
- Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, et al. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2009; 417:651-66.
- Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014; 123:1552-5.
- Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. *JAK2* or *CALR* mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014; 123:1544-51.

JAK2 and Myeloproliferative Neoplasms

30. 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 IFN α treatment. *Leukemia* 2014; 28:460-3.
31. Kralovics R, Sokol L, Broxson EH Jr, et al. The erythropoietin receptor gene is not linked with the polycythemia phenotype in a family with autosomal dominant primary polycythemia. *Proc Assoc Am Physicians* 1997; 109:580-5.
32. Kralovics R, Prchal JT. Genetic heterogeneity of primary familial and congenital polycythemia. *Am J Hematol* 2001; 68:115-21.
33. Sulahian R, Cleaver O, Huang LJ. Ligand-induced EpoR internalization is mediated by JAK2 and p85 and is impaired by mutations responsible for primary familial and congenital polycythemia. *Blood* 2009; 113:5287-97.
34. Teofili L, Larocca LM. Advances in understanding the pathogenesis of familial thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2011; 152:701-12.
35. El-Harith el-HA, Roessel C, Ballmaier M, et al. Familial thrombocytosis caused by the novel germ-line mutation p.Pro106Leu in the MPL gene. *Br J Haematol* 2009; 144:185-94.
36. Vilaine M, Gourain V, Cleyrat C, et al. Germline MPLW515R mutation in a family with isolated thrombocytosis. *54th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH)* 2012; Abstract 1764.
37. Kondo T, Okabe M, Sanada M, et al. Familial essential thrombocythemia associated with one-base deletion in the 5'-untranslated region of the thrombopoietin gene. *Blood* 1998; 92:1091-6.
38. Wiestner A, Schlemper RJ, van der Maas AP, et al. An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. *Nat Genet* 1998; 18:49-52.
39. Mead AJ, Chowdhury O, Pecquet C, et al. Impact of isolated germline JAK2V617I mutation on human hematopoiesis. *Blood* 2013; 121:4156-65.
40. Rumi E, Harutyunyan AS, Casetti I, et al. A novel germline JAK2 mutation in familial myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* 2014; 89:117-8.
41. Etheridge SL, Cosgrove ME, Sangkhae V, et al. A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis. *Blood* 2014; 123:1059-68.
42. Marty C, Saint Martin C, Pecquet C, et al. Germline JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood* 2014; 123:1372-83.
43. Plo I, Zhang Y, Le Couedic JP, et al. An activating mutation in the CSF3R gene induces a hereditary chronic neutrophilia. *J Exp Med* 2009; 206:1701-7.
44. Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA, et al. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N Engl J Med* 2013; 368:1781-90.
45. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324:930-5.
46. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009; 360:2289-301.
47. Saint-Martin C, Leroy G, Delhommeau F, et al. Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 114:1628-32.
48. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 2011; 20:11-24.
49. Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2011; 20:25-38.
50. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet* 2012; 44:1179-81.
51. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2011; 29:1373-81.
52. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010; 18:553-67.
53. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013; 27:1861-9.
54. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, et al. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011; 25:1219-20.
55. Challen GA, Sun D, Jeong M, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet* 2012; 44:23-31.
56. Thol F, Damm F, Ludeking A, et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29:2889-96.
57. Cho YS, Kim EJ, Park UH, et al. Additional sex comb-like 1 (ASXL1), in cooperation with SRC-1, acts as a ligand-dependent coactivator for retinoic acid receptor. *J Biol Chem* 2006; 281:17588-98.
58. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* 2012; 22:180-93.
59. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 145:788-800.
60. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010; 70:447-52.
61. Abdel-Wahab O, Gao J, Adli M, et al. Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med* 2013; 210:2641-59.
62. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, et al. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011; 25:1200-2.
63. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010; 42:722-6.
64. Guglielmelli P, Bianchi F, Score J, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood* 2011; 118:5227-34.
65. Muto T, Sashida G, Oshima M, et al. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 co-operates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med* 2013; 210:2627-39.
66. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011; 478:64-9.
67. Zhang SJ, Rampal R, Manshouri T, et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood* 2012; 119:4480-5.
68. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, et al. U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are strongly associated with anemia and thrombocytopenia despite clustering with JAK2V617F and normal karyotype. *Leukemia* 2014; 28:431-3.
69. Klampff T, Harutyunyan A, Berg T, et al. Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood* 2011; 118:167-76.
70. Harutyunyan A, Klampff T, Cazzola M, et al. p53 Lesions in leukemic transformation. *N Engl J Med* 2011; 364:488-90.
71. Beer PA, Delhommeau F, LeCouedic JP, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood* 2010; 115:2891-900.
72. Thoenissen NH, Krug UO, Lee DH, et al. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010; 115:2882-90.
73. Bhagwat N, Levine RL, Koppikar P. Sensitivity and resistance of JAK2 inhibitors to myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* 2013; 97:695-702.
74. Harrison C, Kiladjan JJ, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012; 366:787-98.
75. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012; 366:799-807.
76. Verstovsek S, Kantarjian HM, Estrov Z, et al. Long-term outcomes of 107 patients with myelofibrosis receiving JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib: survival advantage in comparison to matched historical controls. *Blood* 2012; 120:1202-9.
77. Tefferi A, Litzow MR, Pardanani A. Long-term outcome of treatment with ruxolitinib in myelofibrosis. *N Engl J Med* 2011; 365:1455-7.
78. Talpaz M, Paquette R, Afrin L, et al. Interim analysis of safety and efficacy of ruxolitinib in patients with myelofibrosis and low platelet counts. *J Hematol Oncol* 2013; 6:81.
79. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, et al. A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. *Cancer* 2014; 120:513-20.
80. Santos FP, Kantarjian HM, Jain N, et al. Phase 2 study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *Blood* 2010; 115:1131-6.
81. Moliterno AR, Hexner E, Roboz GJ, et al. An open-label study of CEP-701 in patients with JAK2 V617F-positive PV and ET: update of 39 enrolled patients. *51st Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, LA, 2009; 114:313-314.*
82. Pardanani A, Laborde RR, Lasho TL, et al. Safety and efficacy of CYT387, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *Leukemia* 2013; 27:1322-7.
83. Komrokji RS, Wadleigh M, Seymour JF, et al. Results of a phase 2 study of pacritinib (SB1518), a novel oral JAK2 inhibitor, in patients with primary, post-polycythemia vera, and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. *53rd Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology (ASH)/ Symposium on the Basic Science of Hemostasis and Thrombosis* 2011; 118:130-131.
84. Koppikar P, Abdel-Wahab O, Hedvat C, et al. Efficacy of the JAK2 inhibitor INCB16562 in a murine model of MPLW515L-induced thrombocytosis and myelofibrosis. *Blood* 2010; 115:2919-27.
85. Jaekel N, Behre G, Behning A, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in patients pretreated with the JAK1 and JAK2 inhibitor ruxolitinib. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49:179-84.
86. Tefferi A. Challenges facing JAK inhibitor therapy for myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2012; 366:844-6.
87. Deshpande A, Reddy MM, Schade GO, et al. Kinase domain mutations confer resistance to novel inhibitors targeting JAK2V617F in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2012; 26:708-15.
88. Weigert O, Lane AA, Bird L, et al. Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition. *J Exp Med* 2012; 209:259-73.
89. Koppikar P, Bhagwat N, Kilpivaara O, et al. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. *Nature* 2012; 489:155-9.
90. Gabler K, Behrmann I, Haan C. JAK2 mutants (eg, JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms. *JAKSTAT* 2013; 2:e25025.
91. Dusa A, Mouton C, Pecquet C, et al. JAK2 V617F constitutive activation requires JH2 residue F595: a pseudokinase domain target for specific inhibitors. *PLoS One* 2010; 5:e11157.

92. Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, et al. Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19:754-9.
93. Marubayashi S, Koppikar P, Taldone T, et al. HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans. *J Clin Invest* 2010; 120:3578-93.
94. Chiosis G, Timaou MN, Lucas B, et al. A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells. *Chem Biol* 2001; 8:289-99.
95. Fiskus W, Verstovsek S, Manshouri T, et al. Heat shock protein 90 inhibitor is synergistic with JAK2 inhibitor and overcomes resistance to JAK2-TKI in human myeloproliferative neoplasm cells. *Clin Cancer Res* 2011; 17:7347-58.
96. Guerini V, Barbui V, Spinelli O, et al. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 selectively targets cells bearing mutated JAK2(V617F). *Leukemia* 2008; 22:740-7.
97. Wang Y, Fiskus W, Chong DG, et al. Cotreatment with panobinostat and JAK2 inhibitor TG101209 attenuates JAK2V617F levels and signaling and exerts synergistic cytotoxic effects against human myeloproliferative neoplastic cells. *Blood* 2009; 114:5024-33.
98. Evrot E, Ebel N, Romanet V, et al. JAK1/2 and pan-deacetylase inhibitor combination therapy yields improved efficacy in preclinical mouse models of JAK2V617F-driven disease. *Clin Cancer Res* 2013; 19:6230-41.
99. Mascarenhas J, Lu M, Li T, et al. A phase I study of panobinostat (LBH589) in patients with primary myelofibrosis (PMF) and post-polycythaemia vera/essential thrombocythaemia myelofibrosis (post-PV/ET MF). *Br J Haematol* 2013; 161:68-75.
100. DeAngelo DJ, Mesa RA, Fiskus W, et al. Phase II trial of panobinostat, an oral pan-deacetylase inhibitor in patients with primary myelofibrosis, post-essential thrombocythaemia, and post-polycythaemia vera myelofibrosis. *Br J Haematol* 2013; 162:326-35.
101. Wang JC, Chen C, Dumlaio T, et al. Enhanced histone deacetylase enzyme activity in primary myelofibrosis. *Leuk Lymphoma* 2008; 49:2321-7.
102. Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, et al. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 2005; 18:601-7.
103. Garcon L, Rivat C, James C, et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 2006; 108:1551-4.
104. Nelson EA, Walker SR, Weisberg E, et al. The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood* 2011; 117:3421-9.
105. Bar-Natan M, Nelson EA, Walker SR, et al. Dual inhibition of Jak2 and STAT5 enhances killing of myeloproliferative neoplasia cells. *Leukemia* 2012; 26:1407-10.
106. Pecquet C, Staerk J, Chaligne R, et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. *Blood* 2010; 115:1037-48.
107. Choong ML, Pecquet C, Pendharkar V, et al. Combination treatment for myeloproliferative neoplasms using JAK and pan-class I PI3K inhibitors. *J Cell Mol Med* 2013; 17:1397-409.
108. Khan I, Huang Z, Wen Q, et al. AKT is a therapeutic target in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2013; 27:1882-90.
109. Bartalucci N, Guglielmelli P, Vannucchi AM. Rationale for targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in myeloproliferative neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; 13(suppl 2):S307-9.
110. Bartalucci N, Tozzi L, Bogani C, et al. Co-targeting the PI3K/mTOR and JAK2 signalling pathways produces synergistic activity against myeloproliferative neoplasms. *J Cell Mol Med* 2013; 17:1385-96.
111. Guglielmelli P, Barosi G, Rambaldi A, et al. Safety and efficacy of everolimus, an mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis. *Blood* 2011; 118:2069-76.
112. Nakatake M, Monte-Mor B, Debili N, et al. JAK2(V617F) negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene* 2012; 31:1323-33.
113. Lu M, Wang X, Li Y, et al. Combination treatment in vitro with Nutlin, a small-molecule antagonist of MDM2, and pegylated interferon-alpha 2a specifically targets JAK2V617F-positive polycythemia vera cells. *Blood* 2012; 120:3098-105.
114. Lu M, Wang J, Li Y, et al. Treatment with the Bcl-xL inhibitor ABT-737 in combination with interferon alpha specifically targets JAK2V617F-positive polycythemia vera hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2010; 116:4284-7.
115. Waibel M, Solomon VS, Knight DA, et al. Combined targeting of JAK2 and Bcl-2/Bcl-xL to cure mutant JAK2-driven malignancies and overcome acquired resistance to JAK2 inhibitors. *Cell Rep* 2013; 5:1047-59.
116. Gautier EF, Picard M, Laurent C, et al. The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2V617F oncogene. *Blood* 2012; 119:1190-9.
117. Wernig G, Gonneville JR, Crowley BJ, et al. The Jak2V617F oncogene associated with myeloproliferative diseases requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood* 2008; 111:3751-9.
118. Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, et al. Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. *J Biol Chem* 2006; 281:18177-83.
119. Nieborowska-Skorska M, Kopinski PK, Ray R, et al. Rac2-MRC-cIII-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. *Blood* 2012; 119:4253-63.
120. Marty C, Lacout C, Droin N, et al. A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia* 2013; 27:2187-95.
121. Hurtado-Nedelec M, Csillag-Grange MJ, Boussetta T, et al. Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. *Haematologica* 2013; 98:1517-24.
122. Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood* 2008; 112:3065-72.
123. Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, et al. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2006; 108:2037-40.
124. Mullally A, Bruedigam C, Poveromo L, et al. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon-alpha in a murine model of polycythemia vera. *Blood* 2013; 121:3692-702.
125. Lu M, Zhang W, Li Y, et al. Interferon-alpha targets JAK2V617F-positive hematopoietic progenitor cells and acts through the p38 MAPK pathway. *Exp Hematol* 2010; 38:472-80.
126. Quintas-Cardama A, Abdel-Wahab O, Manshouri T, et al. Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2013; 122:893-901.
127. Essers MA, Offner S, Blanco-Bose WE, et al. IFNalpha activates dormant hematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 2009; 458:904-8.
128. Mehrotra S, Sharma B, Joshi S, et al. Essential role for the Mnk pathway in the inhibitory effects of type I interferons on myeloproliferative neoplasm (MPN) precursors. *J Biol Chem* 2013; 288:23814-22.
129. Kiladjian JJ, Masse A, Cassinat B, et al. Clonal analysis of erythroid progenitors suggests that pegylated interferon alpha-2a treatment targets JAK2V617F clones without affecting TET2 mutant cells. *Leukemia* 2010; 24:1519-23.
130. Smith EM, Boyd K, Davies FE. The potential role of epigenetic therapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2010; 148:702-13.
131. Liu F, Zhao X, Perna F, et al. JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell* 2011; 19:283-94.

2. COMPLEXITE GENETIQUE DES NMP ET PREDISPOSITION GENETIQUE

2.1. Complexité génétique des NMP et prédisposition aux NMP dans la population générale

Il apparaît clair aujourd'hui que les NMP sont des pathologies complexes au plan génétique. Si les mutations associées à la progression de la maladie sont relativement bien identifiées (mutations d'*IDH1/2*, de *TP53*, de *RUNX1*, de *SRSF2*, d'*ASXL1*) [169], les mécanismes à l'origine du développement des NMP demeurent mal connus.

JAK2V617F, *MPLW515X* et les mutations de *CALR* sont des mutations « driver » c'est à dire qu'elles sont responsables du phénotype et du développement de maladie. Ceci est notamment mis en évidence par leur capacité à entraîner le développement d'un NMP dans les modèles murins. Toutes trois impliquent une dérégulation des voies de signalisation en aval du complexe récepteur à cytokines-JAK2. Elles ne sont cependant pas équivalentes, que ce soit en terme de voies de signalisation activées ou de dominance clonale (données non publiées du laboratoire). De plus, l'étude de l'inactivation du chromosome X a mis en évidence des profils de clonalité différents entre les mutations *JAK2V617F* et les mutations de *CALR* [198], soulignant la complexité génétique des ces pathologies.

Il apparaît que *JAK2V617F* n'est que rarement capable de déclencher à lui seul la maladie. Cette mutation ne donne en effet que peu d'avantage de prolifération au compartiment des CSH, que ce soit dans des modèles murins ou chez l'homme. En effet, lorsque une seule CSH *JAK2V617F* est transplantée dans des souris, seule un animal sur 100 développe un NMP, témoignant de la faible capacité de *JAK2V617F* à engendrer par lui même un phénotype et suggérant l'existence de facteurs associés [199]. La capacité des mutations de *MPL* et *CALR* à initier la maladie devra être étudiée, puisqu'elles ne semblent être pas équivalentes d'un point de vue fonctionnel à *JAK2V617F*. Il a d'autre part été mis en évidence que la transformation en LAM des NMP pouvait être due au clone responsable du phénotype du NMP ou d'un clone indépendant [200] [201] [202], comme en témoigne l'observation, dans environ 20% des cas, de transformation en LAM *JAK2V617F* négative d'un NMP *JAK2V617F* positif, avec présence d'anomalies cytogénétiques identiques dans les clones positifs et négatifs pour *JAK2V617F*. De plus, l'observation chez un même patient de deux mutations « driver », *JAK2V617F* et *CALR*, dans des clones différents, suggère l'existence d'événements génétiques préalables favorisant la survenue ou la sélection de ces mutations de signalisation. Par ailleurs, une étude de 2008 a mis en évidence un risque multiplié de 5 à 7 fois de développer un NMP pour les sujets apparentés au premier degré d'un patient atteint de ce type de pathologie [203]. Enfin, les mutations de *TET2* peuvent dans certains cas précéder le développement de maladies hématologiques, mais peuvent

également apparaître après l'acquisition de *JAK2V617F* [173] [204], ce qui est en faveur d'une acquisition stochastique de ces mutations. Ces éléments sont donc en faveur de l'existence d'événements génétiques associés aux mutations driver ou de conditions particulières (prédisposition, allèle de susceptibilité, vieillissement, inflammation...) qui favoriseraient l'initiation des NMP. Il existe à l'heure actuelle deux hypothèses, non exclusives, sur leur mécanisme. Ces événements pourraient induire un phénotype d'hypermutabilité, en altérant par exemple les mécanismes de réparation de l'ADN ou de la réponse aux dommages de l'ADN, favorisant l'acquisition de mutations de signalisation. Ils pourraient également représenter un avantage de sélection pour des clones mutés préexistants à une faible fréquence dans l'hématopoïèse de la population générale, incapables de se développer seuls. Récemment, des mutations *JAK2V617F*, de *TET2* et de *DNMT3* [205] [206] [180] [207] [208] [209] ont été identifiées dans la population générale, retrouvées plus fréquemment chez des sujets âgés, au sein d'une hématopoïèse clonale mais en absence de signes de NMP. Ces hémopathies sont des pathologies du sujet âgé et le vieillissement du système hématopoïétique pourrait être un facteur d'initiation des NMP en favorisant l'expansion clonale ou en modifiant le comportement de cellules mutées présentes chez des sujets sains.

Des facteurs héréditaires pourraient également participer à l'initiation des NMP (Figure 9). L'haplotype 46/1 ou GGCC favorise l'acquisition en *cis* de *JAK2V617F* [210] [211] et des mutations *MPLW515X* [212], avec une pénétrance faible. Cet haplotype serait un rtQTL (replication timing quantitative trait loci) qui favoriserait l'utilisation d'une origine de réplication particulière et créerait des interférences entre les machineries de réplication et de transcription, entraînant l'apparition de mutations de *JAK2* [213]. L'haplotype 46/1 n'a pas d'impact sur les mutations de *CALR* [214] [215]. Une association entre un variant de *TERT* (telomerase reverse transcriptase), une transcriptase inverse appartenant au complexe de la télomérase, *TERT* rs2736100, et les trois types de NMP (TE, PV et MFP) a été plus récemment mise en évidence, d'abord dans la population islandaise, puis dans une cohorte ethniquement variée [216] [217] [109]. Ce variant est également associé à des taux d'hémoglobine, de plaquettes et de leucocytes plus élevés chez les sujets sains, suggérant que son rôle s'exercerait au niveau d'un progéniteur myéloïde commun. *TERT* rs2736100 est retrouvé indifféremment en présence de *JAK2V617F* ou de mutations de *CALR*. Plus récemment, l'association entre plusieurs SNP (single-nucleotide polymorphisms) et l'apparition de NMP a été rapportée : rs12339666 situé dans *JAK2* et rs2201862 en aval de *MECOM* qui s'associent plus fréquemment avec les NMP *JAK2V617F* négatifs, ainsi que rs9376092, localisé entre les gènes *HBS1L* et *MYB*, qui semble favoriser les TE *JAK2V617F* [109].

Ces variants sont fréquents dans la population générale mais leur pénétrance faible n'influence que modérément le développement des NMP. De plus, ils n'expliquent pas les

agrégations familiales de NMP qui semblent être dues à des anomalies génétiques plus rares mais avec une pénétrance plus importante.

2.2. Les NMP familiaux

Le terme de NMP familiaux est employé lorsqu'on dénombre au sein d'une même famille au moins deux sujets atteints de TE, PV et/ou MFP, mais aussi de LMC ou de mastocytose systémique (MS). La prévalence de ces formes familiales est probablement sous estimée, puisqu'environ 8% des cas considérés comme sporadiques présentent des antécédents familiaux de NMP [218]. Ces agrégations familiales de NMP sont un argument fort en faveur de l'existence de facteurs de prédisposition génétique germinaux à ces pathologies. Les NMP familiaux ne doivent pas être confondus avec les formes familiales d'érythrocytoses (qui seront discutées plus loin), de thrombocytoses ou de neutrophilies, qui sont des pathologies polyclonales touchant électivement une lignée myéloïde et dont le mode de transmission avec une pénétrance quasi-complète est différent.

2.2.1. Aspects génétiques

Contrairement à l'haplotype 46/1 qui augmente le risque de développer un NMP de deux à trois fois par rapport à la population générale, il est attendu que la prédisposition génétique responsable des NMP familiaux, plus rare, ait une pénétrance plus importante. Effectivement, la transmission est généralement de type autosomique dominante (AD) avec une pénétrance le plus souvent incomplète [219] [220] [218]. Une transmission autosomale récessive n'a cependant pu être exclue dans certains cas [203]. Un phénomène d'anticipation, c'est à dire un diagnostic plus précoce chez les sujets de la seconde génération par rapport à ceux de la première génération, a été souvent observé [218] [221] mais cette donnée demeure variable [203].

2.2.2. Description

Au sein d'une famille de NMP, le phénotype est le plus souvent (environ 60% des cas) homogène, c'est à dire que tous les sujets sont atteints de la même pathologie, le plus souvent de PV puis de TE. Dans 40% des cas, il est hétérogène, associant des cas de TE, PV, PMF et parfois de LMC et de MS [220] [222] [218]. On observe le plus fréquemment une association entre PV et MFP [223].

La présentation clinique et l'évolution des cas familiaux sont semblables à celle des cas sporadiques [218]. Certaines études ont mis en évidence un âge au diagnostic plus jeune

[219] [220], mais cette donnée n'a pas été systématiquement confirmée [218]. Enfin, les complications thromboemboliques et hématologiques, ainsi que la survie globale, sont superposables à celles des cas sporadiques [224, 225].

Les anomalies moléculaires acquises dans les cas familiaux de NMP sont variées et semblables à celles observées dans les cas sporadiques [226] [227] [228] [229] [230]. Cependant la fréquence de *JAK2V617F* semble différente dans certains cas familiaux, probablement en raison de sa ségrégation au sein d'une même famille puisque 68% d'entre elles présentent une distribution homogène de la mutation. La charge allélique est par contre semblable à celle observée dans les cas sporadiques. [218].

2.2.3. Prédilection aux NMP familiaux

La pénétrance généralement incomplète et l'âge au diagnostic relativement avancé observés dans ces familles de NMP suggèrent que la prédisposition génétique ne causerait pas directement l'apparition de la maladie mais favoriserait l'acquisition de mutations oncogéniques. D'autre part, l'observation d'une hématoïèse clonale chez les sujets malades et d'une pousse autonome de colonies érythroïdes clonales au sein d'une hématoïèse polyclonale chez des sujets sains d'une même famille suggère que, dans certains cas, plusieurs anomalies génétiques pourraient être responsables de la prédisposition familiale à ces hémopathies [219].

Des mutations germinales de *JAK2* (V617I [231], R564K [232], 2R867Q et S755R/R938Q [233], H608N [234]) et de *MPL* (S505N) [139] ont été mises en évidence dans des cas de thrombocytoses familiales, tout comme des mutations constitutives d'*EPOR* dans les érythrocytoses familiales et de *CSF3R* (colony stimulating factor 3 receptor) dans les neutrophilies familiales. Cependant, ni *JAK2V617F*, ni les autres mutations de *JAK2* ou de *MPL*, ne sont responsables de la prédisposition génétique aux NMP familiaux [235] [220] [222] [236] [218]. D'autres gènes ou *loci* candidats ont également été éliminés (*EPOR*, 20q, 13q, 5q, 9p) [219].

Plusieurs facteurs de prédisposition aux NMP ont été récemment mis en évidence. L'association de TERT rs2736100 est plus forte avec les cas familiaux de NMP qu'avec les cas sporadiques, indiquant un rôle potentiel de ce variant dans l'agrégation familiale, ce qui n'est pas observé pour l'haplotype 46/1 [217]. Une étude récente réalisée dans le laboratoire a permis d'identifier pour la première fois une anomalie génomique responsable d'une prédisposition génétique aux NMP familiaux [237]. Ce travail reposait sur l'analyse de 4 familles d'origine martiniquaise, associant des cas de LMMC, de LAM et de NMP classiques non BCR-ABL, avec environ deux tiers de patients atteints de TE dont la moitié avait progressé rapidement en MF et/ou LAM secondaires. La transmission était AD. Les patients

étaient plus jeunes que dans les cas sporadiques, avec un âge au diagnostic moyen de 41 ans. Les anomalies moléculaires acquises étaient semblables aux cas sporadiques pour les mutations de *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *IDH1/2* et *ASXL1*. Les mutations de *TET2* étaient retrouvées avec une fréquence accrue (38%). Aucune mutation de *TP53* n'a été mise en évidence alors que sa fréquence est d'environ 30% dans les LAM post-NMP sporadiques. Une duplication de 700pb en 14q32.2, incluant notamment les gènes *TCL1A*, *GSKIP*, *ATG2B*, *BDKRB1* et *BDKRB2*, a été identifiée, ségrégant avec la maladie avec une pénétrance de plus de 80%. Cette variabilité du nombre de copie (CNV, copy number variation) n'était pas présente dans la base de données DGVS (database of genomic variants) et n'a pas été retrouvée dans 199 échantillons d'ADN de sujets de même origine géographique, ni dans 98 cas familiaux de NMP caucasiens. La première partie de ce travail a permis de caractériser les conséquences fonctionnelles de la duplication. Des lignées iPSC (induced pluripotent stem cell) ont été dérivées de cellules CD34⁺ de deux patients et différents clones porteurs de la duplication ont été obtenus (CNV+), soit de façon isolée, soit associée à une mutation hétérozygote *JAK2V617F* et avec ou sans mutation de *TET2*. La présence de la duplication augmentait le nombre de progéniteurs hématopoïétiques aboutissant à une surproduction d'érythroblastes, de monocytes et surtout de mégacaryocytes. La réponse à la TPO a donc été étudiée. La seule présence de la duplication dans les iPSC induisait une pousse spontanée des CFU-MK (colony forming unit-megacaryocyte), amplifiée en présence de *JAK2V617F*. La présence de la mutation de *TET2* n'avait pas d'impact. La duplication entraînait également une augmentation de la taille et de la ploïdie des MK matures. La prédisposition coopérait également avec *JAK2V617F* mais aussi *TET2* muté pour la réponse des progéniteurs hématopoïétiques à l'EPO. L'étude de la signalisation retrouvait pour les lignées associant la duplication et *JAK2V617F*, une phosphorylation spontanée de STAT5, ERK et AKT. Les résultats sur la sensibilité des progéniteurs aux cytokines ont été confirmés dans les cellules primaires de patients avec une pousse spontanée des CFU-MK et, dans une moindre mesure, des BFU-E chez les sujets porteurs de la duplication. Cet effet était amplifié en présence de *JAK2V617F*. La prédisposition et *JAK2V617F* semblent donc agir de façon synergique sur l'hématopoïèse. Les mutations de *TET2* et d'*IDH1* étaient responsables d'une augmentation de la taille des colonies érythroïdes. La seconde partie de ce travail avait pour objectif d'identifier le ou les gène(s) de la duplication responsables de la prédisposition. L'étude de leur niveau d'expression a mis en évidence une augmentation de l'expression d'*ATG2B* (autophagy related 2B) et de *GSKIP* (GSK3B interacting protein) dans des lignées cellulaires issues de patients et transformées par l'EBV (Epstein-Barr virus) par rapport à des lignées contrôles, ainsi que dans les mégacaryocytes de patients. *ATG2B* est un gène de l'autophagie, pouvant affecter l'auto-renouvellement des CSH. *GSKIP* code pour GSK3β, impliquée dans la mégacaryopoïèse normale et l'homéostasie des CSH, mais aussi dans l'accélération de

LMC et dans la formation de cellules souches leucémiques. La diminution de l'expression d'*ATG2B2* et/ou de *GSKIP* par ARN interférence dans les progéniteurs CD34⁺ de patients et dans les iPSC CNV+ a mis en évidence une coopération de ces deux gènes. Au total, cette étude a identifié un nouveau *locus* de prédisposition incluant deux gènes, *ATG2B* et *GSKIP*, responsable de l'induction d'hémopathies myéloïdes malignes avec une pénétrance élevée. Nos données actuelles suggèrent que ce *locus* n'induit pas un phénotype par lui-même mais est plutôt responsable d'un phénomène d'initiation qui modifierait le comportement de cellules préexistantes porteuses de mutations acquises, comme *JAK2V617F*, et induirait leur dominance clonale. Il a en effet été montré que certaines mutations peuvent être présentes chez des sujets âgés ne présentant aucune hémopathie [205] [206] [180] [207] [208] [209] (Annexe 2). Enfin des mutations germinales de *RBBP6*, situées au niveau d'un site de liaison à p53, ont été mises en évidence dans environ 5% des cas familiaux de NMP, essentiellement des MFP. Ces mutations affectent l'expression de différents gènes impliqués dans l'apoptose et le cycle cellulaire. Une diminution de l'expression de p53, BAX, BID et USP7 et une augmentation de celle de CDK6 ont été notamment observées. Ces mutations semblent donc réguler négativement la voie p53 et pourraient induire une instabilité génétique, favorisant l'acquisition de mutations somatiques responsables du développement des NMP [238]. (Figure 9)

Si des facteurs de prédisposition aux NMP familiaux ont été récemment mis en évidence, illustrant à la fois l'hypothèse de l'hypermutableté et celle de la sélection de clones préexistants, la variabilité de leurs présentations génétique, clinique et moléculaire suggère que de nombreuses anomalies germinales encore inconnues pourraient être responsables du développement de ces cas familiaux.

3. EPOR ET ERYTHROCYTOSE

3.1. L'érythropoïèse

L'érythropoïèse est un processus dynamique complexe qui assure la production quotidienne de $200 \cdot 10^9$ hématies chez un être humain adulte. Ces cellules sanguines, anucléées chez les mammifères, sont responsables des échanges gazeux de l'organisme : grâce à l'hémoglobine contenue dans leur cytoplasme, elles assurent l'oxygénation des tissus en transportant le dioxygène (O_2) et participent au maintien du pH sanguin en transportant le dioxyde de carbone (CO_2). Cette production continue d'érythrocytes permet de maintenir un taux d'hémoglobine stable, compensant les pertes physiologiques et la destruction des globules rouges vieillissants, dont la durée de vie est d'environ 120 jours.

3.1.1. Description

On distingue l'érythropoïèse primitive ou embryonnaire, qui se produit au niveau du sac vitellin [239], de l'érythropoïèse définitive qui se situe dans le foie fœtal, puis, après la naissance, dans la moelle osseuse, que nous allons détailler dans ce paragraphe (Figure 8).

3.1.1.1. Stades précoces de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse présente une structure pyramidale avec à son sommet une CSH multipotente qui va s'engager dans la voie de différenciation myéloïde, en particulier sous l'influence du FT PU.1 (ou Spi1), donnant naissance à un progéniteur myéloïde commun, le CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocytes / Erythrocyte / Megacaryocyte / Macrophage) [240]. Par la suite, GATA1 (GATA binding protein 1), FT à doigts de zinc qui se lie à des séquences consensus (A/T)GATA(A/G) dans les régions régulatrices de certains gènes, et son partenaire FOG (friend of GATA), en réprimant l'expression du FT myéloïde PU.1, favorisent l'engagement vers les voies de différenciation érythroïde et mégacaryocytaire au détriment de la lignée granuleuse, donnant naissance à un progéniteur appelé CFU-EM (Colony Forming Unit-Erythrocyte/Megacaryocyte) [241] [240]. A ce stade, et toujours en présence de GATA1, l'expression préférentielle du FT EKLF (erythroid Krüppel-like factor, ou KLF1, Krüppel-like factor 1) par rapport à Fli1 (Friend leukemia integration 1), spécifique de la lignée mégacaryocytaire, favorise l'engagement définitif dans la voie de différenciation érythroïde [242], donnant naissance aux BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) puis aux CFU-E, dont les potentialités sont restreintes à cette seule lignée.

Ces cellules ne sont pas morphologiquement identifiables mais peuvent être caractérisées indirectement par leur capacité à former des colonies érythroïdes lorsqu'elles sont cultivées en milieu semi solide : chez l'homme, les BFU-E primitifs forment des colonies de plusieurs milliers d'érythroblastes en 21 jours, les BFU-E matures forment des colonies de plus petite taille en 14 jours et les CFU-E forment des colonies de 30 à 60 érythroblastes en 7 jours (respectivement 9, 7 et 2 jours chez la souris) [243] [244]. L'étude de l'expression de plusieurs marqueurs en cytométrie en flux permet désormais de différencier de façon plus aisée les BFU-E (CD45⁺GPA⁻IL-3R⁻CF34⁺CD36⁻CD71^{low}) des CFU-E (CD45⁺GPA⁻IL-3R⁻CD34⁺CD36⁺CD71^{high}) [245].

Certains marqueurs de surface permettent également de les identifier : les BFU-E les plus immatures expriment l'antigène CD34 et le récepteur du SCF (Stem Cell Factor), c-kit, alors que le marqueur de différenciation CD36, également présent sur les mégacaryocytes et les macrophages, et EPOR n'apparaissent qu'au stade BFU-E mature [244] [246].

3.1.1.2. Stades tardifs de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse

A partir du stade CFU-E, l'érythropoïèse a lieu au niveau d'une structure particulière au sein de la moelle osseuse, l'îlot érythroblastique, composé d'un macrophage central entouré d'une couronne de 5 à plus de 30 érythroblastes à différents stades de maturation [247] [248]. La maturation des CFU-E donne naissance aux précurseurs érythroïdes, les proérythroblastes puis les érythroblastes basophiles, polychromatophiles et enfin acidophiles [249]. Alors que la survie des cellules du stade CFU-GEMM au stade BFU-E nécessite la présence de SCF, les CFU-E, les proérythroblastes et les érythroblastes basophiles immatures sont exclusivement dépendants de l'EPO [250]. Cette dépendance est perdue par la suite et l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-xL, induite par GATA-1 et l'EPO, permet la survie des précurseurs plus matures [251] [252].

Les précurseurs érythroïdes sont cytologiquement identifiables et expriment des marqueurs spécifiques de la lignée érythroïde, comme le Ter119, la glycophorine A ou le CD71, récepteur à la transferrine [253] [254]. A ces stades de maturation correspondent des modifications morphologiques très importantes : diminution de la taille des cellules, condensation de la chromatine, modifications du cytosquelette et perte des organelles [255] [256] [257]. Leur capacité de prolifération décroît graduellement, pour être nulle au stade érythroblaste acidophile, notamment sous l'effet de GATA1 [258]. De plus, la synthèse des chaînes de globines augmente du stade proérythroblaste au stade érythroblaste basophile avant de décroître progressivement. En parallèle est exprimé le récepteur à la transferrine, permettant une importante accumulation de fer, qui est nécessaire à la synthèse de l'hème. Chaque molécule d'hémoglobine est en effet constituée de quatre chaînes de globine,

associées à une molécule d'hème, dont la dernière étape de synthèse, au niveau de la mitochondrie, consiste en l'insertion d'un atome de fer dans une molécule de protoporphyrine IX [259]. Le FT érythroïde EKLF régule l'expression de la chaîne de la β -globine, intervient dans la synthèse de l'hème, permet le maintien de l'intégrité du cytosquelette et de la membrane des érythroblastes [260] [261]. Son rôle dans l'érythropoïèse définitive est donc crucial et les souris KO pour EKLF décèdent au stade fœtal d'une anémie sévère [262] [263].

Après de profondes modifications de leur cytosquelette, les érythroblastes acidophiles vont expulser leur noyau, donnant naissance d'une part à un réticulocyte anucléé et d'autre part à un pyrénocyte, constitué du noyau condensé entouré d'une membrane lipidique [264]. L'expression à sa surface de phosphatidyl-sérines sert de signal « eat-me », entraînant sa phagocytose par le macrophage de l'îlot érythroblastique [265].

La phagocytose du noyau après l'énucléation n'est pas le seul rôle de l'îlot érythroblastique, qui intervient à chaque stade de l'érythropoïèse tardive. Il favorise notamment la survie des érythroblastes matures et régule l'apoptose des érythroblastes immatures par un mécanisme paracrine faisant intervenir le récepteur de mort Fas, exprimé par les précurseurs les plus immatures, et Fas-ligand (Fas-L), exprimé par les érythroblastes matures. L'interaction entre Fas et Fas-L induit une apoptose caspases-dépendante des précurseurs immatures. Le macrophage de l'îlot assure le recyclage du fer contenu dans ces érythroblastes. Ce mécanisme permet à l'état basal une régulation de la production d'hématie en fonction de la quantité d'érythroblastes matures présents au sein de l'îlot érythroblastique [266] [267]. En cas d'érythropoïèse de stress, ce contingent de précurseurs immatures normalement voués à l'apoptose, peut être rapidement mobilisé [268].

D'autre part, tout au long de la différenciation érythroïde, certaines caspases sont ponctuellement activées et clivent des protéines comme la lamine B et acinus, participant aux modifications morphologiques des érythroblastes sans induire d'apoptose [269]. A ce stade, GATA-1 est protégé du clivage par les caspases par HSP70, dont la localisation est à la fois cytoplasmique et nucléaire. En cas de privation en EPO, HSP70 est délocalisée dans le cytoplasme et GATA-1 est clivé par la caspase 3, entraînant l'apoptose des érythroblastes [270].

3.1.1.3. Stades tardifs de l'érythropoïèse dans le sang périphérique

Le réticulocyte quitte la moelle osseuse, et, après 72 heures dans la circulation sanguine et une réorganisation particulière de son cytosquelette, se transforme en hématie [271]. De forme biconcave caractéristique, les érythrocytes sont dépourvus d'organelles et contiennent de grandes quantités d'hémoglobine dans leurs cytoplasmes. Leur demi-vie est d'environ 28

jours dans la circulation sanguine. Les globules rouges sénescents présentent des modifications de leurs membranes reconnues par les macrophages de la rate, du foie et de la moelle osseuse, qui vont les phagocyter [272]. Le fer est alors soit stocké dans les macrophages par la ferritine, soit recyclé vers la moelle osseuse pour l'érythropoïèse par la transferrine.

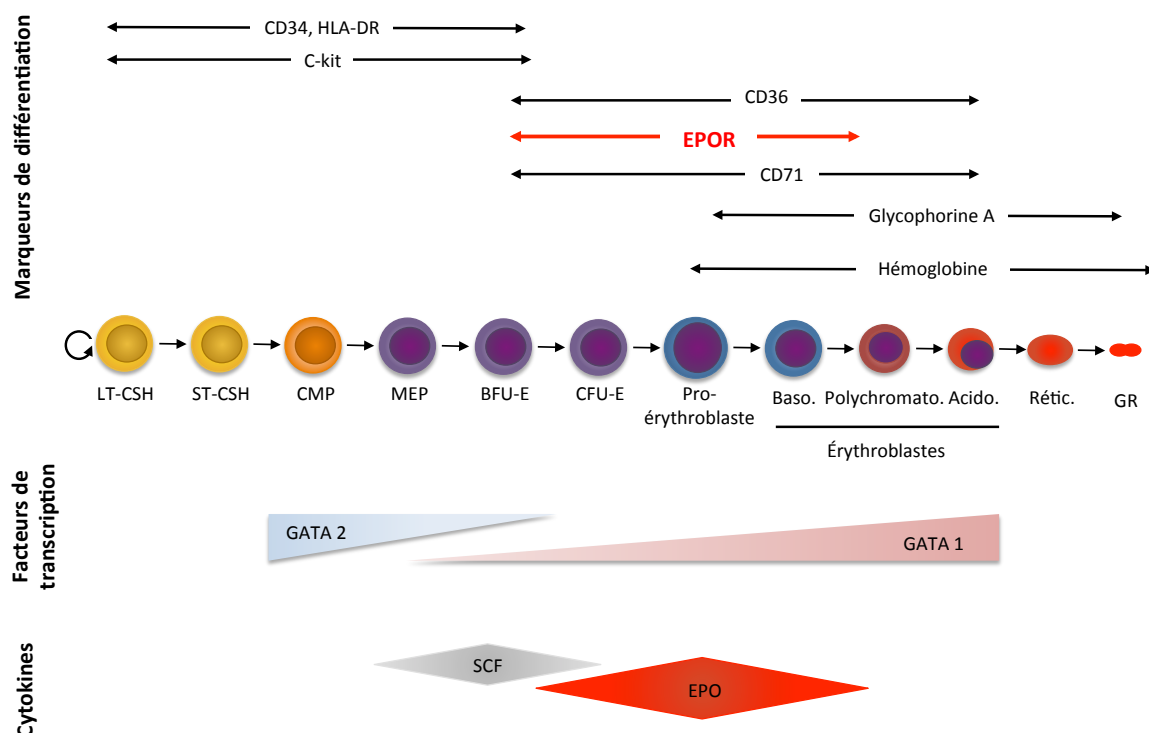


Figure 5 : Erythropoïèse

3.1.2. Régulation de l'érythropoïèse par les besoins en O₂

L'érythropoïèse est un processus dynamique finement régulé, la production des hématies devant être adaptée aux besoins en O₂ des tissus périphériques. L'EPO est un acteur essentiel de cette boucle de régulation, comme en témoigne son taux sanguin qui est inversement corrélé au taux d'hémoglobine. Les souris KO pour l'EPO ou son récepteur meurent d'anémie profonde à J13 de vie embryonnaire, soulignant leurs rôles cruciaux dans l'érythropoïèse. L'EPO, glycoprotéine de 34 kDa, est synthétisée par des fibroblastes particuliers, possiblement d'origine neuronale [273], adjacents aux cellules tubulaires proximales du rein qui ont d'importants besoins en O₂ [274] [275]. HIF2 α (hypoxia-inducible factor 2 α) est le régulateur intracellulaire principal de la production d'EPO [276] [277] [278]. Il appartient à un complexe transcriptionnel qui se lie à des HRE (hypoxia-responsive element), situés dans les régions régulatrices de nombreux gènes, dont l'EPO [279]. En condition de normoxie, deux résidus prolines de HIF2 α sont hydroxylées par les protéines

PHD (prolyl hydroxylase domain), permettant le recrutement de la protéine VHL (von Hippel-Lindau) qui poly-ubiquitine HIF2 α , entraînant sa dégradation par le protéasome et donc une diminution de la production d'EPO. En condition d'hypoxie, les protéines PHD sont inactives et HIF2 α , stabilisé, s'accumule et active la transcription de gènes de réponse à l'hypoxie, provoquant notamment une synthèse accrue d'EPO par les cellules interstitielles rénales [280] [281]. L'EPO, par l'intermédiaire d'EPOR et des voies de signalisation en aval qui seront détaillées par la suite, entraîne une augmentation de la survie et de la prolifération des précurseurs érythroïdes [252]. D'autre part, en condition d'hypoxie, HIF2 α augmente la transcription de la transferrine et de son récepteur, de l'ALAS2 (aminolevulinic acid synthase 2) impliquée dans la synthèse de l'hème et de GATA-1 [282] [283] [284] [285], et inhibe celle de l'hepcidine. Synthétisée par les hépatocytes, cette molécule régule négativement l'absorption du fer par les entérocytes et son relargage par les macrophages. Son inhibition favorise donc la disponibilité du fer, nécessaire à l'érythropoïèse [286] [287]. Ces différents mécanismes concourent à augmenter la production d'hématies, permettant de corriger l'hypoxie. L'apport d'O₂ aux cellules tubulaires rénales par ces globules rouges nouvellement formés sert alors de boucle de régulation négative, entraînant la diminution de la production d'EPO par les fibroblastes péri-tubulaires et une apoptose des précurseurs érythroïdes.

En conditions physiologiques, cette boucle de régulation systémique de l'érythropoïèse par les besoins en O₂ permet de maintenir un taux d'hémoglobine stable, par des ajustements permanents. Elle permet, en cas de stress hypoxique aigu du, par exemple, à un saignement ou une hémolyse, d'augmenter rapidement la production de globules rouges grâce à la capacité de prolifération très importante des précurseurs EPO dépendants, notamment en diminuant l'expression de Fas à leur surface [288].

Des mécanismes de stimulation de l'érythropoïèse indépendants de l'EPO existent également en cas d'érythropoïèse de stress. Il a en effet été démontré que les glucocorticoïdes stimulent la prolifération des BFU-E et inhibent leur différenciation. Ces cellules possèdent donc une capacité d'auto-renouvellement limitée, qui permet cependant une amplification importante du compartiment des CFU-E et donc une augmentation considérable de la production de globules rouges [253].

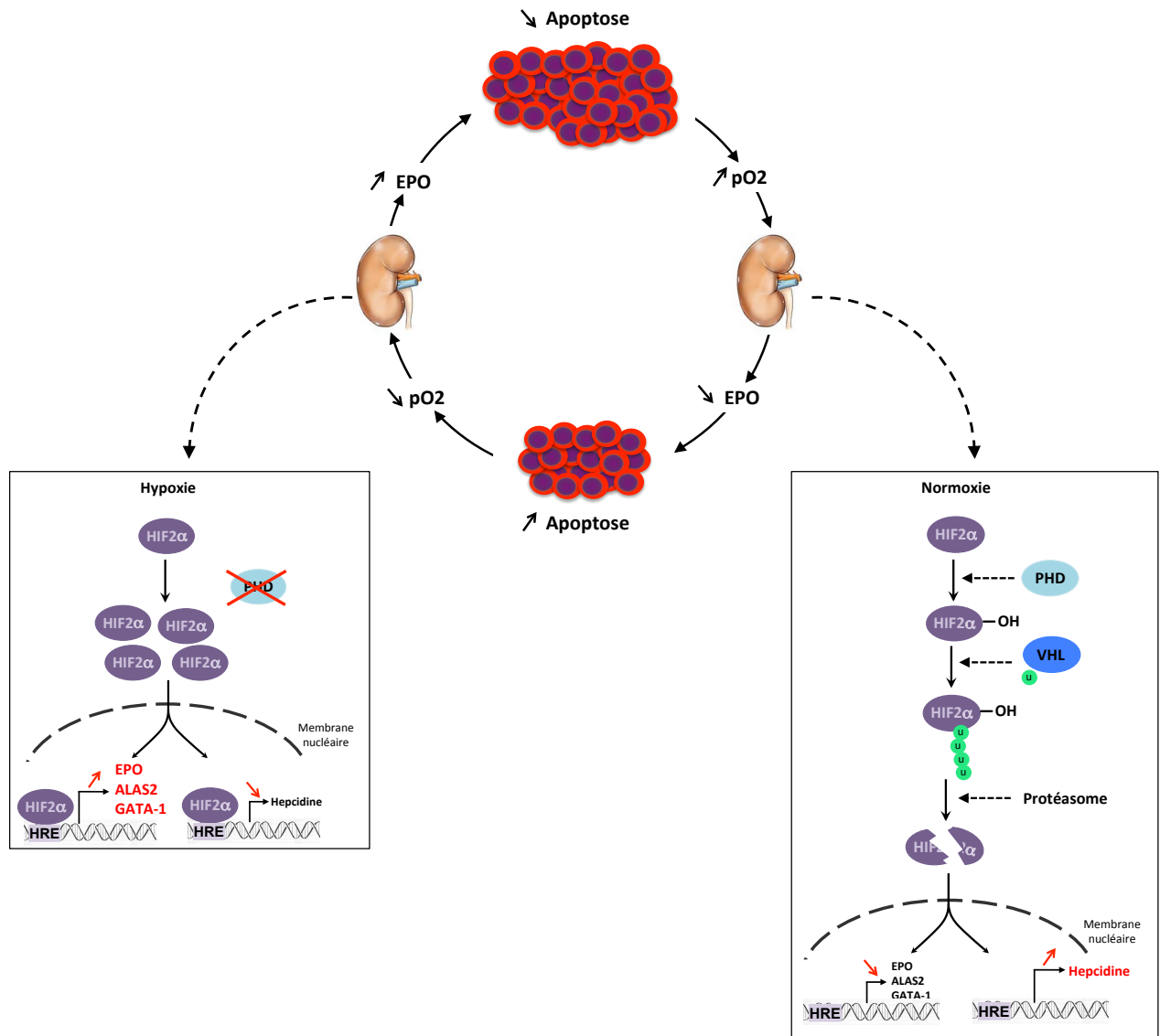


Figure 6 : Régulation de la synthèse d'EPO par la pO₂.

En condition d'hypoxie, HIF2 α est stabilisée et active la transcription de gènes de réponse à l'hypoxie, notamment l'EPO dont la production accrue entraîne une augmentation de la survie et de la prolifération des précurseurs érythroïdes. En condition de normoxie, HIF2 α est hydroxylée par les protéines PHD, poly-ubiquitinylée par VHL et dégradée par le protéasome, provoquant une diminution de la production d'EPO et donc de la prolifération et la survie des érythroblastes.

3.2. Le récepteur à l'érythropoïétine (EPOR)

3.2.1. Expression d'EPOR

EPOR fait partie de la famille des récepteurs à cytokines de type 1 homodimériques [289] [290] [291], tout comme les récepteurs au G-CSF ou à la TPO. Il est exprimé par les progéniteurs érythroïdes BFU-E et CFU-E, ainsi que par les proérythroblastes et les

érythroblastes basophiles immatures. Il est présent en faible quantité à la surface cellulaire avec un maximum d'environ 1000 récepteurs à la membrane des CFU-E [246]. EPOR est également exprimé dans certains tissus non hématopoïétiques, comme l'endothélium, le système nerveux central ou le myocarde [292].

3.2.2. Structure

EPOR est situé en 19p13.2-13.3 chez l'Homme [293] et au niveau du chromosome 9 chez la souris [294]. L'ADN complémentaire de l'EPOR humain, identifié en 1990, comprend 1524 nucléotides et 8 exons. Son ARN messager fait 2,2 Kb et sa demi-vie est de 90 minutes [295], respectivement 1,8 Kb et 75 minutes pour le récepteur murin [296]. Sa transcription est notamment régulée par GATA-1. La protéine humaine est constituée de 508 AA [297], le récepteur murin, cloné en 1989 [291], 507 AA. Les séquences protéiques humaines et murines présentent une homologie de 82%. Les principales régions fonctionnelles de ces récepteurs sont donc conservées, exceptés la présence d'une insertion entre les AA 71 et 76 et d'un site de N-glycosylation dans la partie intra-cytoplasmique du récepteur humain [297].

La partie extracellulaire d'EPOR, d'environ 230 AA, est constituée d'un domaines D1, qui associe des caractéristiques de domaine fibronectine de type III et de domaine d'immunoglobuline, et d'un domaine D2 fibronectine de type III classique [298]. Elle comprend des zones d'homologie avec les autres récepteurs de sa famille, notamment 4 cystéines conservées formant des ponts disulfures et un motif WXSXW (Tryptophane-Sérine-X-Tryptophane-Sérine) [290] qui est important pour le repliement du récepteur dans le RE et sa montée à la surface cellulaire [299] [300].

Son domaine transmembranaire unique est nécessaire pour la pré-dimérisation du récepteur [78].

La partie intracellulaire d'EPOR, de 236 AA [291], est dénuée d'activité enzymatique. Elle comprend, dans sa partie proximale, des régions conservées au sein de la famille des récepteurs à cytokines de type 1, impliquées dans la liaison à JAK2 : la box1 (AA 257-264), la box2 (AA 303-313) ainsi que la séquence située entre ces deux domaines (AA 265-302) [80]. La box1 est nécessaire mais insuffisante à elle seule pour la liaison à JAK2 [301]. La partie intra-cytoplasmique distale du récepteur contient 8 résidus tyrosines conservés, en position 368, 426, 454, 456, 468, 489 et 504 (anciennement 343, 401, 429, 431, 443, 460, 464 et 479), nécessaires à la transduction du signal.

3.2.3. Maturation d'EPOR

Dès le RE, EPOR existe sous forme de dimère en conformation inactive, lié à JAK2. Selon leur degré de maturation, différentes formes d'EPOR, de 64 KDa, 66 KDa et 78 KDa, peuvent être détectées, cette dernière correspondant à la forme mature du récepteur [302]. L'association à JAK2 est essentielle pour la maturation par N-glycosylation du récepteur et son expression à la surface cellulaire [77] [78]. Les domaines JH3 et JH7 de JAK2 sont nécessaires à cette fonction de chaperonne, qui est indépendante de son activité kinase [70]. D'autre part, la partie N-terminale d'EPOR est nécessaire à la traversée du Golgi et à la montée à la surface cellulaire [70]. La majorité des molécules d'EPOR nouvellement synthétisées demeurent bloquées dans le RE et sont dégradées sans avoir été exprimées à la surface cellulaire, suggérant que le repliement de la protéine n'est pas optimal [299]. *A contrario*, dans les cellules UT-7 transduites, il a été observé que la majorité des récepteurs étaient exprimés à la surface cellulaire [303].

3.2.4. Fonctions d'EPOR dans l'érythropoïèse et voies de signalisation

L'EPO et son récepteur ne sont nécessaires ni à l'engagement dans la lignée érythroïde ni à la prolifération des BFU-E ou leur différenciation en CFU-E, mais ont un rôle crucial pour la prolifération et la différenciation terminale à partir du stade CFU-E [250], comme en témoigne les modèles murins de KO pour *EPO* ou *EPOR*, qui sont létaux à 13.5 jours de vie embryonnaire en raison d'une anémie sévère due à un blocage de l'érythropoïèse au stade CFU-E.

EPOR est présent à la surface cellulaire sous forme dimérisée inactive. La formation de dimères de récepteur est essentielle à la signalisation [304] [305]. Lorsque qu'une molécule d'EPO se fixe à son récepteur, elle provoque des changements conformationnels, dont la formation d'un angle de 120° entre les domaines extracellulaires D1 et D2 et d'une hélice alpha rigide par les domaines transmembranaire et juxta-membranaire, nécessaires à une activation optimale d'EPOR [306] [307] [308] [309]. Par transphosphorylation, les molécules de JAK2 associées au récepteur s'activent et vont phosphoryler les tyrosines conservées de la région C-terminale d'EPOR [80]. Les résidus juxta-membranaires L253, I257 et W258, qui forment un motif hydrophobe, ainsi que leur orientation, sont essentiels à l'activation de JAK2 [309]. L'association de JAK2 à EPOR, qui est dépourvu d'activité enzymatique, est donc nécessaire à la transduction du signal [310] [311].

Les p-Tyr intra-cytoplasmiques servent de site de liaison pour les domaines SH2 des protéines de signalisation. Il s'agit de domaines d'environ 100 AA, dépourvus d'activité

enzymatique, dont certaines séquences sont hautement conservées [312]. Les principales voies de signalisation activées par EPOR sont la voie JAK-STAT, la voie PI3K-AKT et la voie des MAPK. L'inhibition des deux premières entraîne une apoptose des progéniteurs érythroïdes et une diminution de la production d'hématie alors que la voie des MAPK ne semble avoir qu'un effet limité à l'érythropoïèse terminale [313].

STAT1, STAT3 et STAT5 peuvent être activés par JAK2 après s'être liés, grâce à leur domaine SH2, à certaines p-Tyr de la partie C-terminale d'EPOR [314] [315]. Les tyrosines en position 368 et 426 sont les principaux sites de liaison de STAT5 à EPOR [316, 317], alors que la tyrosine 456 est nécessaire à l'activation de STAT1 et STAT3 [318]. Une fois activés, les STAT se dimérisent puis sont transloqués dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles [319] [81]. STAT5 va notamment réguler positivement l'expression de la molécule anti-apoptotique bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large), protégeant les cellules érythroïdes de l'apoptose [320] [321] [322]. Les souris KO pour STAT5a et STAT5b présentent une anémie modérée en période foetale, due à une augmentation de l'apoptose des progéniteurs érythroïdes, mais les souris adultes ont un phénotype normal, soulignant que la voie JAK2-STAT n'est pas la seule voie de signalisation essentielle en aval d'EPOR [320].

L'activation de la voie PI3K/AKT en aval d'EPOR est nécessaire, bien qu'insuffisante, à la survie des cellules érythroïdes par inhibition de l'apoptose, ainsi qu'à leur prolifération [323] [324] [325]. PI3K peut être recrutée et activée par différents mécanismes : par liaison directe de sa sous-unité régulatrice p85 à la p-Tyr en position 504 du récepteur [326], par l'intermédiaire des protéines adaptatrices Gab1 et 2 (growth factor-bound protein (Grb)-associated binder) qui se lient au niveau des p-Tyr 368 et 426 d'EPOR, par le recrutement d'IRS2 (insulin receptor substrate-2) ou encore par l'intermédiaire de GRB2 qui, une fois recrutée au niveau de la p-Tyr 485 d'EPOR, active RAS qui phosphoryle la PI3K [327] [328]. La sous-unité catalytique de la PI3K, p110, phosphoryle alors le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en PIP3, qui sert de messenger entre la membrane plasmique et les molécules de signalisation intracellulaires. PIP3 recrute la sérine/thréonine kinase AKT qui est alors activée par phosphorylation de sa sérine en position 473. Une des cibles principales de la voie PI3K/AKT en aval d'EPOR est GATA-1, dont l'activité, cruciale tout au long de la différenciation érythroïde, est augmentée par phosphorylation de sa sérine en position 310 [329]. D'autre part, AKT inhibe l'activité du FT FoxO3A [330] [331], entraînant une diminution de la transcription de ses gènes cibles. Il en découle notamment une réduction de l'expression de protéines pro-apoptotiques comme BIM [332], ou antiprolifératives telles que BTG1 (B cell translocation gene 1) [333]. D'autre part, par l'intermédiaire du complexe ubiquitine E3 ligase SCF Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2), la PI3K provoquerait la dégradation par le protéasome de p27^{Kip1}, inhibiteur du

cycle, favorisant donc la prolifération cellulaire [328]. La PI3K peut également activer la voie des MAPK.

Cette-ci est en effet également impliquée dans la signalisation d'EPOR [334]. Par l'intermédiaire du complexe SHC-Grb2-SOS qui se lie aux p-Tyr [335], RAS est phosphorylé et active différentes voies des MAPK en aval. La protéine lipase C γ 1 peut également servir de molécule adaptatrice entre la p-Tyr 504 et Grb2-SOS, conduisant à l'activation de RAS, indépendamment de la PI3K [336]. L'EPO active aussi bien la voie ERK, qui favorise la survie et la prolifération cellulaires, notamment par l'intermédiaire du FT ELK-1, que les voies p38 MAPK et JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinases / Stress-activated protein kinases) qui ont une fonction pro-apoptotique [337] [338]. RAF, en agissant sur l'activité des caspases, contrôlerait dans une certaine mesure l'apoptose et la différenciation des cellules érythroïdes [339]. Il existerait une balance entre ces différentes voies de survie, de prolifération, d'apoptose et de différenciation activées par l'EPO.

EPOR favorise donc la survie et la prolifération des progéniteurs et précurseurs érythroïdes les plus immatures, notamment les CFU-E et proérythroblastes qui sont exclusivement dépendant de l'EPO, mais aussi la différenciation érythroïde terminale. (Figure 5)

3.2.5. Régulation négative d'EPOR

Comme nous l'avons vu précédemment, le signal induit par les cytokines doit être finement régulé afin de prévenir une activation anormale des voies de signalisation.

3.2.5.1. Rétrocontrôle négatif de la signalisation

Après liaison de l'EPO à son récepteur, celui-ci est rapidement activé mais le niveau de phosphorylation d'EPOR revient à son niveau basal en 30 minutes [340].

La phosphatase SHP1, dont l'expression est induite par l'EPO, se lie aux p-Tyr 454 et 456 d'EPOR et participe à la terminaison du signal en déphosphorylant et donc en inactivant JAK2 [84].

Les SOCS participent également à l'arrêt de la signalisation d'EPOR. L'expression de CIS est notamment induite par la voie JAK2/STAT5. CIS se lie à la p-Tyr 426 et, par compétition allostérique, empêche la liaison d'autres protéines à ce résidu tyrosine, inhibant donc le signal [87]. SOCS3 se lie aussi aux p-Tyr 426, 454 et 456.

SHIP, les PIAS et CBL participent également au rétrocontrôle négatif du signal.

3.2.5.2. Internalisation et dégradation d'EPOR

L'internalisation et la dégradation des récepteurs à cytokines permettent également de contrôler l'amplitude et la durée du signal, régulant donc la réponse aux signaux extracellulaires [341].

Ces mécanismes sont spécifiques à chaque récepteur. L'internalisation et la dégradation du GH-R sont par exemple constitutives et peu augmentées en présence de la GH [342] [343], alors que celles d'EPOR ou MPL sont induites après la liaison de leur ligand. En effet, la liaison de l'EPO à son récepteur provoque rapidement son internalisation et sa dégradation puisque la demi-vie d'EPOR à la membrane cellulaire est de 3h en absence d'EPO et de 15 min en présence de la cytokine [302] [303] [344]. Après 30 minutes de stimulation, environ 75% des récepteurs disparaissent de la surface cellulaire [303]. Seule une faible quantité d'EPOR est recyclée après son internalisation [303] [345], alors que la majorité des molécules de MPL sont recyclées à la surface cellulaire après internalisation, assurant une signalisation durable, notamment de la voie ERK nécessaire à la différenciation mégacaryocytaire [346] [347]. La limitation du signal induit par l'EPO apparaît donc comme cruciale à la maturation de la lignée érythrocytaire.

Les mécanismes exacts conduisant à l'internalisation et à la dégradation d'EPOR ne sont actuellement pas totalement connus. Cependant plusieurs études ont mis en évidence qu'EPOR, en présence de JAK2 activé, était rapidement ubiquitinylé après liaison de l'EPO [348] [345] [349] [303]. L'ubiquitination correspond à la liaison covalente d'une molécule d'ubiquitine à une lysine d'une protéine cible. Ce processus fait intervenir l'enzyme E1 qui active une molécule d'ubiquitine par une réaction ATP-dépendante puis la transfère à l'enzyme E2. Celle-ci, en coopération avec une E3 ubiquitine-ligase, permet la conjugaison de l'ubiquitine à la protéine cible par formation d'un isopeptide reliant le substrat à l'ubiquitine. L'enzyme E3 est responsable de la spécificité de la réaction d'ubiquitination. Une mono-ubiquitination provoque le trafic intracellulaire de la protéine cible alors qu'une poly-ubiquitination correspond à un signal de dégradation de la protéine cible pour le protéasome. EPOR murin comprend 5 lysines dans sa partie intra cytoplasmique, le récepteur humain 6, en positions 279, 275, 301, 373, 413 et 453.

L'ubiquitination d'EPOR est nécessaire à l'internalisation du récepteur par un mécanisme d'endocytose liée aux clathrines [348] [345] [349] [303], comme cela a été démontré pour les récepteurs EGF (epidermal growth factor) [350] ou à l'IL2 [351]. L'internalisation d'EPOR est dépendante de l'activation de JAK2 [303]. Plusieurs mécanismes différents semblent intervenir dans ce processus. D'une part, une étude a montré que l'ubiquitination de la lysine 256 du récepteur murin (équivalente à la lysine 279 du récepteur humain en nouvelle nomenclature) était suffisante à l'internalisation du récepteur [345], mais l'E3 ligase impliquée dans ce processus n'a pas été identifiée. D'autre part, un mécanisme dépendant

des p-Tyr 454, 456 et 504 de la partie intra-cytoplasmique d'EPOR a été décrit. Ces p-Tyr recruteraient la p85, sous-unité régulatrice de la PI3K par son domaine SH2 C-terminal, indépendamment de l'activité kinase de la PI3K. En parallèle, CBL, une E3-ligase, après liaison au domaine SH2 N-terminal de p85, l'ubiquitylerait, permettant le recrutement de l'epsin-1, protéine adaptatrice faisant le lien entre les protéines ubiquitylées et la machinerie d'endocytose liée aux clathrines. Ce processus d'endocytose liée aux clathrines dépendant des p-Tyr d'EPOR est dépendant de l'activation de JAK2 [348] [349]. Cependant, dans une autre étude, l'inhibition de la fonction E3 ligase de CBL, par mutagénèse et ARN interférence, n'avait pas d'incidence majeure sur l'ubiquitination d'EPOR [303]. Le mécanisme précis responsable de l'endocytose liée aux clathrines d'EPOR doit donc être clarifié.

Une fois internalisé, le complexe EPO-EPOR est dirigé vers les lysosomes pour y être dégradé [345]. Ce processus est également dépendant de l'activation de JAK2 [303]. Il a été mis en évidence que l'ubiquitination de la lysine 428 d'EPOR murin (équivalente à la lysine 453 du récepteur humain en nouvelle nomenclature) était nécessaire au routage du récepteur vers les lysosomes et donc à sa dégradation [345].

La dégradation d'EPOR n'est cependant pas uniquement dépendante des lysosomes, le protéasome y participant également, comme en témoignent l'utilisation d'inhibiteurs de cette voie [303] [344] [352]. Une étude a montré que la β Trcp (beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase), une E3 ligase à domaine RING finger qui se lie à un motif DSG conservé d'EPOR, ubiquitylait rapidement la partie intracellulaire du récepteur après liaison de l'EPO, entraînant la dégradation de la partie C-terminale d'EPOR par le protéasome [353]. Il a été démontré que la liaison du GM-CSFR, de l'IL-5R et de l'IL-7R à leur ligand induisait la dégradation de la partie intra-cytoplasmique de leur sous-unité β par le protéasome. Ces récepteurs, avec une partie intracellulaire résiduelle de 25 à 35 AA, sont incapables de transduire le signal, entraînant la terminaison de celui-ci. La dégradation de la sous unité β par le protéasome est nécessaire à l'internalisation de ces récepteurs ainsi qu'à leur dégradation par les lysosomes [354], ce qui ne semble pas être le cas pour EPOR [303]. Plusieurs mécanismes, plus ou moins synergiques et/ou redondants, régulent donc l'endocytose et la dégradation d'EPOR. Après liaison de l'EPO, le protéasome dégraderait la partie intracellulaire d'EPOR précédemment poly-ubiquitylée par la β Trcp, alors que, de façon indépendante, la partie N-terminale liée à l'EPO serait dégradée par les lysosomes après un processus d'endocytose liée aux clathrines par un mécanisme dépendant des p-Tyr d'EPOR [303]. L'ubiquitination, l'endocytose et la dégradation d'EPOR semblent être dépendantes de l'activation de JAK2. (Figure 7)

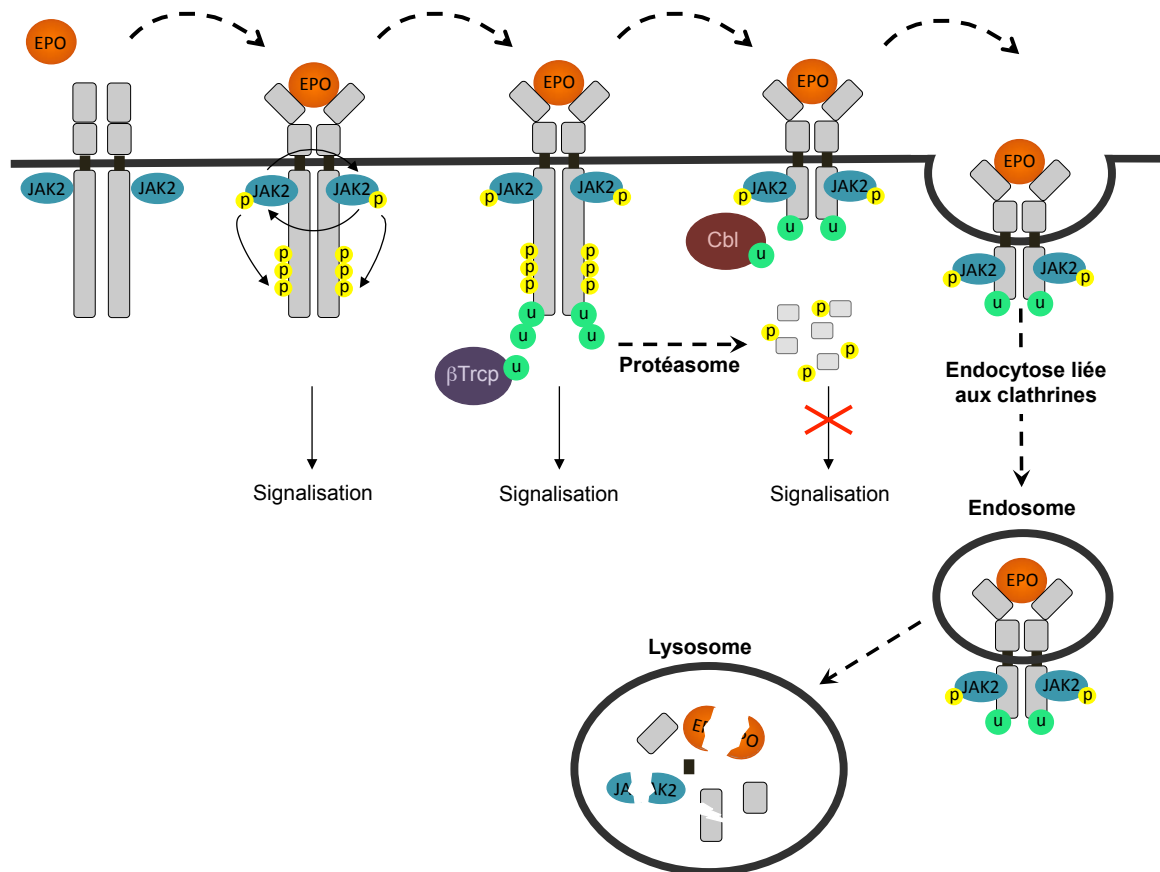


Figure 7 : Modèle d'internalisation et de dégradation d'EPOR après stimulation par l'EPO.

Après liaison de l'EPO à EPOR, le récepteur et les voies de signalisation en aval sont activés. Rapidement, la bTRCP ubiquitine l'extrémité C-terminale d'EPOR entraînant sa dégradation par le protéasome. Cbl, par l'intermédiaire de p85, ubiquitine à son tour EPOR provoquant son internalisation par un mécanisme d'endocytose liée aux clathrines puis son routage vers les lysosomes où le récepteur et la cytokine sont dégradés. L'internalisation et la dégradation d'EPOR permettent de réguler l'amplitude et la durée du signal induit par l'EPO.

3.3. Erythrocytoses familiales et mutations d'EPOR

Les érythrocytoses familiales (EF) sont des pathologies congénitales rares, héréditaires et bénignes, qui touchent exclusivement la lignée érythroïde au sein d'une hématopoïèse polyclonale [355], ce qui les différencie des « vrais » NMP. La mutation germinale est responsable du phénotype, contrairement à ce qui est observé dans les prédispositions génétiques aux NMP familiaux. Dans la majorité des cas, la mutation causale n'est pas connue [356]. En effet, les quelques 160 anomalies identifiées à ce jour (www.erythrocytosis.org, www.lovd.nl/2.0/) ne concernent que 30% des sujets atteints [357].

Dans les cas où aucune anomalie moléculaire n'a été mise en évidence le terme d'érythrocytose idiopathique est employé [358].

Biologiquement, ces pathologies se traduisent par une polyglobulie isolée, pouvant être responsable d'un syndrome d'hyperviscosité et de complications thromboemboliques, provoquant dans certaines études une morbidité et une mortalité accrues [359] [360] [361]. Contrairement aux PV, les EF ne présentent pas d'EEC, ni d'évolution vers une MF ou une LAM [362] [363] [364] [365] [366]. Enfin, les anomalies moléculaires acquises décrites dans les NMP ne sont pas observées dans ces pathologies.

On distingue les EF primitives, dues à un défaut intrinsèque des progéniteurs érythroïdes, des EF secondaires [361].

3.3.1. EF secondaires

Les EF secondaires, caractérisées par un taux d'EPO circulant élevé [367], résultent de mutations de gènes impliqués dans l'affinité de l'hémoglobine à l'O₂ ou dans la régulation de la concentration en O₂ de l'organisme.

3.3.1.1. Modification de l'affinité de l'Hb à l'O₂

3.3.1.1.1. Anomalies des chaînes de globines α et β

HBA et *HBB*, qui codent pour les chaînes de l' α -globine et de la β -globine, sont situés respectivement en 16p13.3 et 11p15.4. Plus de 100 anomalies de ces gènes ont été décrites, concernant en majorité la chaîne de la β -globine. Ces variants de l'Hb présentent une affinité augmentée pour l'O₂, déplaçant la courbe de dissociation de l'O₂ vers la gauche et entraînant une hypoxie tissulaire, responsable de l'augmentation du taux d'EPO et de la production d'hématies. Ils sont décrits dans une base de données complète et régulièrement mise à jour, HbVar (<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>).

3.3.1.1.2. Anomalie de *BPGM* (2,3-bisphosphoglycerate mutase)

L'enzyme BPGM contrôle le niveau de 2,3-BPG, qui, lié à l'Hb, diminue son affinité pour l'O₂ [368], favorisant l'apport d'O₂ aux tissus périphériques. Un déficit en BPGM est donc responsable d'une hypoxie tissulaire, provoquant une augmentation de la production de globules rouges. Ces anomalies sont extrêmement rares, seules trois cas ayant été décrits dans la littérature [369] [370] [371].

3.3.1.1.3. Méthémoglobinémie

La méthémoglobinémie est due à une forme non fonctionnelle d'Hb où la molécule de fer ferreux Fe²⁺ est remplacée par une molécule de fer ferrique Fe³⁺, qui ne peut pas lier l'O₂,

entraînant une hypoxie tissulaire. En conditions physiologiques, la méthémoglobine est réduite par des méthémoglobine réductases et ne correspond qu'à 1% de l'hémoglobine totale. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'une méthémoglobinémie, notamment l'HbM qui se transmet selon un mode AD. Il s'agit d'une forme anormale d'Hb qui présente une modification de la poche de l'hème, stabilisant le fer ferrique Fe^{3+} donc l'accumulation de méthémoglobine, entraînant une hypoxie et une érythrocytose secondaire. [372] [373]

Les patients atteints de ces anomalies de l'affinité de l'Hb à l'O₂ sont généralement asymptomatiques. De rares cas de syndrome d'hyperviscosité et de complications thromboemboliques ont été décrits, en corrélation avec une élévation importante du taux d'hématocrite. Il n'y a pas à l'heure actuelle de recommandations thérapeutiques précises les concernant [373] [366], mais la réalisation de saignées ou d'échanges transfusionnels en cas de complications thromboemboliques ont été rapportées [360].

3.3.1.2. Anomalies de la voie de régulation de la concentration en O₂

3.3.1.2.1. VHL

Les anomalies les mieux connues sont celle du gène *VHL*, situé en 3p25.3. L'ARNm de 4.7 Kb peut être traduit à partir de deux sites d'initiation de la traduction. Les deux isoformes de VHL, de 213 AA et 160 AA, sont toutes les deux fonctionnelles [374]. Les mutations perte de fonction de VHL responsables d'EF doivent être différenciées de la maladie VHL qui correspond à un syndrome de transmission AD prédisposant au développement de divers tumeurs bénignes et malignes (hémangioblastomes, phéochromocytomes, cancer du rein) [375]. La première mutation de VHL responsable d'EF, c.598C>T (p.Arg200Trp), homozygote et de transmission autosomale récessive, a été mise en évidence au sein de la population Chuvash de Russie [376]. Dix-sept autres mutations de VHL ont été depuis décrites [366].

L'étude approfondie de la cohorte Chuvash a mis en évidence une augmentation du risque thrombotique, artériel et veineux, ainsi qu'hémorragique chez ces patients [377]. Ils présentent également une pression artérielle pulmonaire supérieure à la normale, voire une hypertension artérielle pulmonaire, responsable d'une mauvaise tolérance à l'hypoxie, même lorsque celle-ci est modérée [378]. Dans deux études, la réalisation de saignées et l'administration d'antiagrégants plaquettaires ne permettaient pas de diminuer l'incidence des complications thromboemboliques [379] [377], mais ces données, rétrospectives, demandent à être confirmées.

3.3.1.2.2. EGLN1 (PHD2)

PHD2 catalyse l'hydroxylation des résidus prolines 405 et 531 de HIF2 α , conduisant à sa dégradation par le protéasome. Dix-sept mutations hétérozygotes de transmission AD d'*EGLN1*, situé en 1q42.1, ont été identifiées [366]. Ces mutations perte de fonction entraînent une diminution de l'activité de PHD2, une stabilisation de HIF2 α et une augmentation de la transcription d'*EPO*, responsable d'une polyglobulie [380]. Aucune mutation des autres membres de la famille PHD (PHD1 et PHD3) n'a été mise en évidence à ce jour.

3.3.1.2.3. EPAS-1 (HIF2 α)

HIF2 α est le FT principal régulant l'expression d'*EPO* [276] [277]. *EPAS-1* est situé en 2p21. Des mutations gain de fonction hétérozygotes de transmission AD, responsables d'EF, ont été identifiées au niveau de l'exon 12 d'*EPAS-1*. Elles se situent à proximité de la proline 531, cruciale pour la dégradation de HIF2 α par le protéasome, entraînant une diminution de la liaison à PHD2 et VHL [366] et donc une stabilisation de HIF2 α .

3.3.2. EF primitives (EFP) et mutations d'EPOR

Les EF primitives (ou PFCP, primitive familial and congenital polycythemia) sont dues à un défaut intrinsèque de la lignée érythroïde, notamment par mutation d'EPOR (Figure 9). Le taux d'EPO circulant est diminué ou subnormal [362] [364] [363] [381] [365]. La symptomatologie est généralement frustre mais des cas de complications thrombotiques artérielles et veineuses ou hémorragiques graves ont été décrites en cas de polyglobulie majeure non contrôlée [382, 383] [364] [365]. La maladie est généralement correctement contrôlée par la réalisation de saignées et la prise en charge des FDR CV. Les traitements myélofreinateurs tels que l'HU ne sont pas indiqués dans ces pathologies [360].

3.3.2.1. Mutations d'EPOR : description

Des mutations constitutives gain de fonction d'*EPOR* ont été identifiées dans environ 10% à 15% des EFP [384] [385], de transmission généralement AD à pénétrance complète [362, 364] [363] [365]. Depuis la première, mise en évidence en 1993 [359], environ une vingtaine de mutations hétérozygotes d'*EPOR* ont été décrites dans les EFP. Elles sont toutes situées au niveau de l'exon 8 qui code pour la partie distale intracellulaire du récepteur où sont localisées les 8 tyrosines conservées nécessaires à la transduction du signal. La majorité d'entre elles sont des mutations non-sens ou de petites insertions ou délétions responsables d'un décalage du cadre de lecture. Elles entraînent toutes l'apparition d'un codon STOP

prématuré et l'amputation d'une partie plus ou moins importante de l'extrémité C-terminale du récepteur, contenant un nombre variable de tyrosines. Ces mutations sont détaillées dans le tableau 2 et la figure 8. Cinq variants d'EPOR dus à des mutations faux-sens ont également été rapportés dans les EFP (tableau 3), mais également dans certains cas familiaux de « vrais » NMP. Leur implication dans la physiopathologie des EFP n'est donc pas claire et il pourrait s'agir de polymorphismes. Seul EPOR p.Arg437His a été étudié au plan fonctionnel, dans un travail qui utilisait des chimères comprenant les parties extracellulaire et transmembranaire du récepteur à l'EGF et la partie intracellulaire d'EPOR, permettant d'étudier spécifiquement l'impact de différentes mutations du domaine C-terminal d'EPOR humain dans la lignée UT7. EPOR p.Arg437His induisait une hypersensibilité à l'EGF, suggérant son implication dans les EFP [386].

Tableau 2 : Mutations entraînant une troncation d'EPOR décrites dans les EFP

ADNc	Protéine	Conséquences structurelles	Référence
c.1141_1142del	p.Pro381Glnfs*2	-127AA	Al Sheikh (2008) [387]
c.1195G>T	p.Glu399*	-110AA	Arcasoy (2002, 1997) [381, 388]
c.1234delT	p.Ser412Argfs*41	-57AA	O'Rourke (2011) [389]
c.1235C>A	p.Ser412*	-97AA	Bento (2013) [356]
c.1242_1276del35	p.Ser415Hisfs*18	-77AA	Gross (2014) [386]
c.1249G>T	p.Glu417*	-92AA	Perrota (2010) [390]
c.1252_1255del	p.Gly418Profs*34	-58AA	Petersen (2004) [391]
c.1271_1272del	p.Phe424*	-85AA	Al Sheikh (2008) [387]
c.1273G>T	p.Glu425*	-84AA	Kralovics (2001) [384]
c.1278C>G	p.Tyr426*	-83AA	Kralovics (2001, 1998) [384] [365] Rives (2007) [392]
c.1281dupT	p.Ile428Tyrfs*17	-65AA	Kralovics (2001, 1997) [363, 384]
c.1285del	p.Leu429Trpfs*24	-57 AA	Al Sheikh (2008) [387]
c.1288dupG	p.Asp430Glyfs*15	-65 AA	Kralovics (2001) [384] ; Sokol (1995)
c.1282_1289dup8	p.Asp430Glufs*26	-54 AA	Watowich (1999)
c.1299C>G	p.Gln434*	-75 AA	Furukawa (1997)
c.1299_1305del	p.Gln434Cysfs*17	-59 AA	Kralovics (2001, 1997) [363, 384]; Arcasoy (1999, 1997) [381,
c.1311_1312del	p.Pro438Metfs*6	-66 AA	Bento (2014) [366]
c.1316G>A ; c.1317G>A	p.Trp439*	-70 AA	de la Chapelle (1993) [362]; Pecy (1998) [394]; Rives
c.1362C>G	p.Tyr454*	-55 AA	Chauveau (2015) [395]

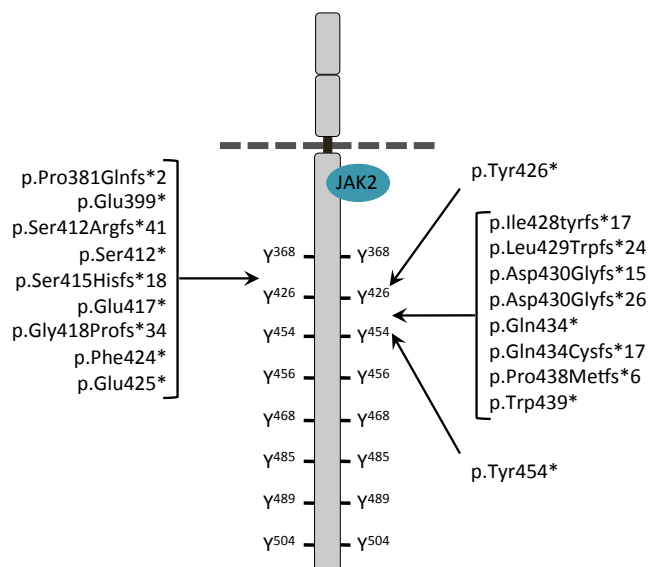


Figure 8 : Mutations tronquantes d'EPOR décrites dans les EFP

Tableau 3 : Mutations substitutions d'EPOR décrites dans les EFP

ADNc	Protéine	Référence
c.634G>T	p.G212C	Jang (2014) [385]
c.1138C>G	p.Pro380Ala	Bento (2014) [366]
c.1310G>A	p.Arg437His	Bento (2014) ; Chauveau (2015) [395] [366]
c.1460A>G	p.Asn487Ser	Le Couedic (1996) [396]; Al Sheikh (2008) [387]
c.1462C>T	p.Pro488Ser	Sokol (1994) [397]; Kravlovics (1997) [363]

3.3.2.2. Mutations d'EPOR dans les EFP : mécanismes

Les mutations d'EPOR dans les EFP sont responsables d'une hypersensibilité à l'EPO, sans pousse spontanée, des progéniteurs érythroïdes de patients lors de cultures clonogéniques en présence de sérum [398] [382] [381] [399] [365] [392] [386]. Cette hypersensibilité à la cytokine a également été observée dans des lignées cellulaires (Ba/F3, 32D ou FDCP1), ainsi que pour des progéniteurs érythroïdes Ter119- transduits par différents récepteurs mutés [382] [381] [399] [365] [400] [392] [387] [349] [348]. Aucune des mutations étudiées n'induisait d'indépendance par rapport à l'EPO.

Une des hypothèses pouvant expliquer le phénotype observé dans les EFP est la perte de domaines de régulation négative du signal, provoquée par l'amputation de la partie C-terminale d'EPOR, entraînant une activation anormale des voies de signalisation et une hypersensibilité à l'EPO. Les p-Tyr 454 et 456, sites de liaison à EPOR de SHP1,

phosphatase responsable de l'inactivation de JAK2, sont notamment systématiquement perdues dans les mutations d'EPOR actuellement connues. Cependant, dans la littérature, seules deux mutations d'EPOR étaient capables d'entraîner une activation plus importante et plus durable de la voie JAK2/STAT5, comparée à EPOR sauvage : EPOR p.Gln434Cysfs*17fs dans la lignée 32D [381] et la chimère EGFR-EPOR p.Ser412* dans la lignée UT7. Seule cette dernière induisait une activation spontanée de STAT5 [386]. Dans cette même étude, EPOR p.Arg437His était responsable d'une activation retardée mais plus durable de la voie ERK en comparaison du récepteur sauvage, ce qui n'était pas le cas pour p.Ser412* ou p.Ser415Hisfs*18 [386]. Ces résultats montrent que l'hypothèse d'une activation anormale des voies de signalisation en aval d'EPOR par perte de la boucle de rétrocontrôle négative du signal induisant une hypersensibilité à l'EPO pouvait s'appliquer à EPOR p.Ser412* mais pas aux autres mutations d'EPOR étudiées. Il apparaît que les effets des mutants d'EPOR sur la signalisation ne sont pas équivalents et qu'une activation anormale, notamment de STAT5, ne peut systématiquement expliquer le phénotype d'hypersensibilité observé.

Un second mécanisme évoqué dans la littérature est l'altération de régions nécessaires à l'internalisation et/ou la dégradation d'EPOR. Il a en effet été démontré que la sensibilité à l'EPO dépendait de la quantité de récepteurs présents à la surface cellulaire [401]. L'étude de Gross *et al.* sur les chimères EGFR-EPOR a mis en évidence une expression plus importante à la membrane et une stabilité plus importante de deux récepteurs à l'EPO tronqués, p.Ser412* et p.Ser415Hisfs*18, comparés au récepteur sauvage et à EPOR p.Arg437His, pouvant en partie être expliquée par une meilleure maturation dans le RE [386]. Le mutant EPOR p.Glu417* était également plus exprimé à la membrane cellulaire dans les cellules primaires qu'EPOR sauvage et l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome ne modifiait pas la quantité d'EPOR muté à la surface cellulaire alors qu'il augmentait celle d'EPOR sauvage [390]. Ces résultats suggèrent un défaut d'internalisation des récepteurs mutés.

Tous les récepteurs tronqués, mis à part EPOR p.Tyr454* perdent le résidu lysine en position 453 ainsi que la lysine 413 pour les 3 mutants dont la perte de la partie C-terminale est la plus importante (p.Pro381Glnfs*2, p.Glu399* et p.Ser412*). Un défaut potentiel d'ubiquitination par perte de ces lysines n'a cependant pas été étudié dans la littérature.

D'autre part, toutes les formes tronquées d'EPOR décrites ont perdu les p-Tyr 454, 456 et 504 qui sont impliquées dans l'endocytose du récepteur liée au clathrines par la voie d'internalisation CBL/p85/Epsin [349] [348]. En effet, le blocage, même partiel, de cette voie d'internalisation par ARN interférence dirigée contre CBL dans la lignée Ba/F3 transduite avec EPOR sauvage et dans des progéniteurs érythroïdes Ter119- était responsable d'une hypersensibilité à l'EPO [348]. De plus, la transduction de deux formes tronquées d'EPOR,

respectivement en position 434 et 452, dans la lignée cellulaire γ 2a était responsable d'une diminution de l'internalisation des récepteurs mutés et d'une hypersensibilité des cellules à l'EPO, par comparaison au récepteur sauvage. En outre, l'adjonction de la séquence KYLYL contenant les p-Tyr 454 et 456 au mutant tronqué en position 452 permettait de restaurer le phénotype sauvage [349]. Enfin, une autre étude a mis en évidence le rôle de la β Trcp pour l'ubiquitination d'EPOR et sa dégradation par le protéasome. La sérine en position 462 d'EPOR, qui est perdue dans les mutations d'EPOR décrites dans les EFP, est nécessaire à la liaison de la β Trcp au récepteur. L'expression dans lignée Ba/F3 d'un mutant EPOR S462A entraînait une activation prolongée du récepteur et une hypersensibilité à l'EPO [353].

D'autre part, tous les récepteurs tronqués décrits, sauf *EPOR* c.1362C>G (p.Tyr454*) [395] perdent la lysine en position 453, équivalente de la lysine 428 du récepteur murin, nécessaire au routage du récepteur internalisé vers les lysosomes et donc à sa dégradation [345]. Cependant, aucune étude de la localisation des récepteurs mutés après internalisation n'a été rapportée dans la littérature.

Il apparaît donc que les mutations d'EPOR, par amputation d'une partie variable de l'extrémité C-terminale du récepteur, entraînent la perte de sites de régulation négative du signal, ainsi qu'un défaut d'internalisation d'EPOR, potentiellement responsables de l'hypersensibilité à la cytokine. Cependant, toutes ces mutations ne sont pas équivalentes et les mécanismes à l'origine du phénotype d'hypersensibilité à l'EPO observé dans les EFP nécessitent encore d'être clarifiés.

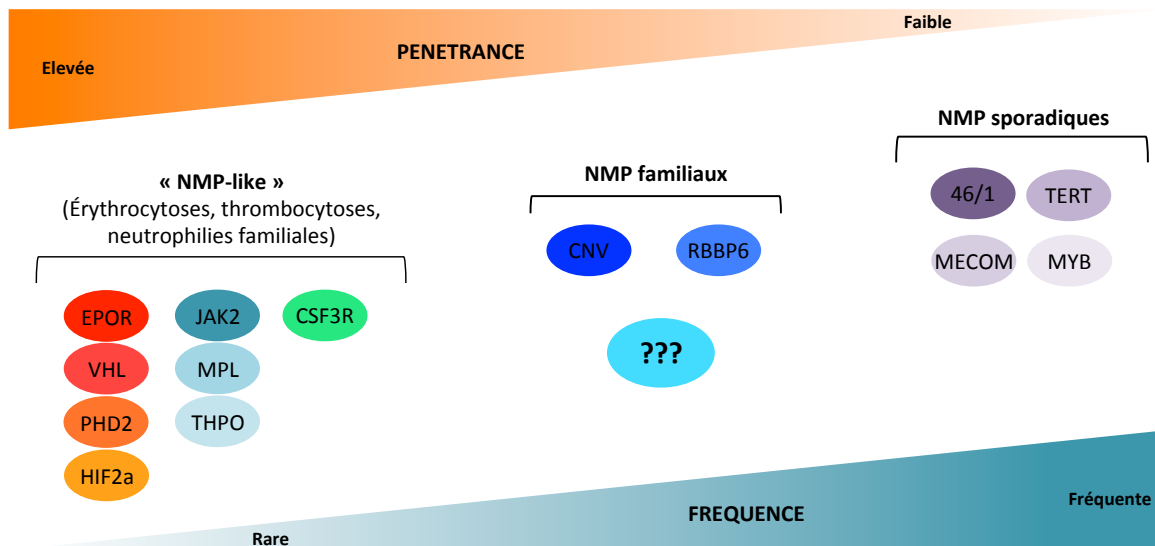


Figure 9 : Prédipositions génétiques aux NMP et aux « NMP-like », selon de leur pénétrance et leur fréquence dans la population générale.

Les cas familiaux peuvent être séparés en deux entités distinctes. La première regroupe les « NMP-like » (érythrocytoses, thrombocytoses et neutrophilies héréditaires) qui affectent une seule lignée myéloïde et se transmettent sur un mode autosomique dominant à pénétrance généralement complète. Des mutations germinales d'EPOR, VHL, PHD2 et HIF2a ont été décrites dans les érythrocytoses, des mutations germinales de JAK2, MPL et THPO dans les thrombocytoses et de CSFR3 dans les neutrophilies. La seconde entité comprend les cas de « vrais » NMP avec prédisposition, qui se transmettent sur un mode autosomique dominant avec une pénétrance incomplète. Une anomalie du nombre de copie de deux gènes (CNV), ATG2B et GSKIP, ainsi que des mutations de RBBP6 ont récemment été décrites dans ce cadre. Ces prédispositions diffèrent des allèles de susceptibilité ou haplotypes présents dans la population générale à forte fréquence mais avec une pénétrance très faible, comme l'haplotype 46/1 ou des variants de TERT, MECOM ou MYB.

4. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les anomalies de signalisation des récepteurs à cytokines de type 1 homodimériques ont une place prépondérante dans le développement des NMP et des EFP.

En effet, dans ces dernières, les mutations d'EPOR sont directement responsables du phénotype observé chez les patients. Bien qu'une vingtaine d'entre elles aient été décrites, le mécanisme de développement de ces pathologies doit être clarifié. L'étude de ces anomalies d'EPOR doit de plus permettre d'améliorer la compréhension du fonctionnement de ce récepteur. Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié une mutation constitutive d'EPOR c.1300dupC (EPOR p.Gln444Profs*11), jamais décrite. Elle a été mise en évidence chez une patiente atteinte d'érythrocytose, présentant un phénotype particulier. L'objectif de ce travail était de caractériser les effets de cette mutation dans les cellules primaires et dans la lignée cellulaire Ba/F3 et d'en étudier le mécanisme.

Les EFP ne doivent pas être confondues avec les « vrais » NMP, qui peuvent parfois se présenter sous forme d'agrégations familiales. De multiples anomalies génétiques sont probablement responsables de leur développement et peu d'études ont permis d'identifier des *loci* de prédisposition. La mise en évidence de facteurs de prédisposition aux NMP devrait permettre non seulement d'améliorer la compréhension du développement de ces maladies mais aussi celles d'autres hémopathies malignes. La deuxième partie de ce travail avait pour objectif d'identifier le rôle d'un variant d'EPOR, p.Pro488Ser, mis en évidence dans une grande famille de NMP. Certains sujets sains de la famille ainsi que tous les patients étaient porteurs du variant d'EPOR. *JAK2V617F* était associé systématiquement au développement du NMP. Notre hypothèse était qu'EPOR p.Pro488Ser représentait un facteur de prédisposition familial au développement de ces pathologies, soit en facilitant l'émergence d'un clone *JAK2V617F* préexistant, soit en induisant l'apparition de cette mutation.

Enfin, malgré de nombreuses avancées dans la compréhension des NMP, notamment la découverte récente des mutations de *CALR* présentes chez environ 25% des patients atteints de TE et MFP, aucune anomalie moléculaire de signalisation connue n'est décelable chez 10% à 15% des patients. La recherche de nouvelles anomalies moléculaires doit donc se poursuivre chez ces sujets triples négatifs. La dernière partie de ce projet a consisté en l'étude fonctionnelle d'une nouvelle mutation de MPL, p.Tyr591Asn, mise en évidence dans une famille de TE évoluant rapidement en LAM, au sein de laquelle une prédisposition génétique consistant en une anomalie du nombre de copie de deux gènes a pu être identifiée lors d'un travail effectué dans la laboratoire.

Résultats

Résultats 1 :

**Erythrocytose congénitale et mutations d'EPOR : étude
d'*EPOR* c.1300dupC (p.Gln434Profs*11)**

Contexte et objectifs du travail

L'érythrocytose est une pathologie bénigne touchant exclusivement la lignée érythroïde et se traduisant par une polyglobulie isolée sans risque d'évolution vers une MF ou une LAM secondaire [362] [364] [363] [381] [365] [355]. Une vingtaine de mutations constitutionnelles d'*EPOR* ont été décrites, entraînant l'apparition d'un codon STOP prématuré et l'amputation d'une longueur variable de l'extrémité C-terminale du récepteur. Les progéniteurs érythroïdes des patients ainsi que les lignées cellulaires dans lesquelles ont été transduits différents mutants d'*EPOR* présentent une hypersensibilité à l'EPO [398] [382] [381] [399] [365] [392] [386] [400] [387] [349] [348]. La perte d'une partie de l'extrémité distale intracellulaire, en entraînant la disparition de sites de régulation négative du signal et de sites d'ubiquitination responsables de l'endocytose et/ou de la dégradation du récepteur, serait à l'origine de l'hypersensibilité à la cytokine.

Nous avons identifié, chez une patiente atteinte d'érythrocytose de phénotype particulier, une nouvelle mutation d'*EPOR*, jamais décrite dans la littérature, *EPOR* c.1300dupC (p.Gln434Profs*11). Le caractère constitutionnel de cette mutation a été confirmé par séquençage de l'ADN extrait des cheveux, des ongles et d'écouvillons buccaux de la patiente.

Le diagnostic de polyglobulie a été posé en 1993, alors que la patiente était âgée de 28 ans. Il s'agissait d'une polyglobulie vraie, isolée, avec un taux d'EPO abaissé. Les explorations médullaires étaient normales, en défaveur d'une PV, ce qui fut confirmé postérieurement par l'absence de mutation *JAK2*V617F ou *JAK2* exon 12. Cependant, contrairement à ce qui est habituellement décrit dans la littérature [382, 398] [381] [399] [365] [392] [386], la culture des progéniteurs érythroïdes mettait en évidence une pousse autonome majeure, supérieure même à celle observée dans les PV. La recherche d'anomalies moléculaires décrites dans les érythrocytoses (*VHL*, *PHD2*, *EPOR*) par séquençage ciblé a permis d'identifier une mutation non connue d'*EPOR*. La patiente est traitée par saignées régulières avec une très bonne tolérance et aucune complication thromboembolique ou hémorragique n'a été à déplorer.

EPOR c.1300dupC (p.Gln434Profs*11) est une duplication d'une cytosine entraînant un décalage du cadre de lecture et la modification de 11 AA en aval ainsi que l'apparition d'un codon STOP en position 444, aboutissant à la perte de 65 AA dans la partie C-terminale du récepteur et de 6 des 8 tyrosines conservées.

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet de cette mutation sur les cellules primaires ainsi que d'en étudier le mécanisme par transduction, dans la lignée cellulaire Ba/F3, de différentes formes d'*EPOR* muté. Nous avons notamment émis l'hypothèse que la seule perte de l'extrémité C-terminale n'expliquait pas le phénotype particulier observé chez la

patiente, mais que la nouvelle séquence peptidique résultant du décalage du cadre de lecture pouvait également jouer un rôle dans la physiopathologie de cette nouvelle mutation. Cet article sera soumis prochainement dans la revue Blood.

Résultats

Nous avons donc étudié une nouvelle mutation constitutionnelle hétérozygote d'EPOR, responsable d'une érythrocytose de phénotype particulier comme en témoignent la présence de colonies érythroïdes endogènes.

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence une hypersensibilité à l'EPO très importante des cellules primaires de la patiente par culture des CD34⁺ en méthylcellulose. En effet, si les progéniteurs érythroïdes ne proliféraient pas indépendamment de la cytokine lors des cultures en absence de sérum, les traces d'EPO présentes dans le sérum suffisaient à induire leur croissance. Le phénotype observé était exclusivement érythroïde, comme attendu dans une érythrocytose, les progéniteurs mégacaryocytaires ne présentant ni pousse spontanée ni hypersensibilité à la TPO. L'étude de la signalisation après stimulation par l'EPO a mis en évidence une activation spontanée et une hypersensibilité à l'EPO de STAT5 et de JAK2 lors des expériences de dose-réponse. Les voies AKT et ERK1/2 n'étaient pas modifiées par rapport aux cellules contrôles. Nous avons ensuite étudié la persistance de la signalisation. Après sevrage, les cellules CD34⁺ à J7 de culture étaient stimulées par de l'EPO pendant 15 minutes puis lavées afin d'éliminer toutes traces de la cytokine qui auraient pu induire des vagues de signalisation répétées. Des points de cinétique ont été réalisés après sevrage, après stimulation par l'EPO et après les lavages. Nous avons pu mettre en évidence une persistance de la phosphorylation de STAT5 et de JAK2 dans les cellules de la patiente jusqu'à 5 heures après stimulation, alors que ces protéines étaient déphosphorylées beaucoup plus rapidement dans les cellules contrôles.

Afin d'étudier le mécanisme d'EPOR p.Gln434Profs*11 et notamment de différencier les effets dus à la seule présence du codon STOP prématuré de ceux dus à la nouvelle séquence peptidique, différents récepteurs ont été transduits dans la lignée cellulaire Ba/F3: le récepteur sauvage (EPOR WT), un récepteur tronqué en position 444 (EPOR STOP), ainsi qu'un récepteur porteur de la mutation *EPOR* c.1300dupC, identique à la forme mise en évidence chez la patiente, associant donc le décalage du cadre de lecture avec la modification des 11 AA et le codon STOP prématuré (EPOR FS). Nous avons observé qu'EPOR FS induisait des anomalies semblables à celles observées dans les cellules primaires, soit une hypersensibilité à l'EPO dans les tests de viabilité de type MTT, une activation spontanée de STAT5 et une persistance de la phosphorylation de STAT5,

comparée au récepteur sauvage. Le mutant EPOR STOP entraînait essentiellement une déphosphorylation plus lente de STAT5, dans une moindre mesure qu'EPOR FS, mais ne modifiait pas la sensibilité des cellules à l'EPO. L'étude de la localisation des récepteurs, par cytométrie en flux et par utilisation d'EPO marquée à l'iode 125 (EPO-I125), a montré une expression basale à la membrane 2 fois plus importante pour EPOR FS que pour les deux autres récepteurs. L'étude de la stabilité des récepteurs par expériences à la cycloheximide a mis en évidence une demi-vie d'EPOR FS plus longue que celles d'EPOR WT et STOP. Un défaut d'internalisation aurait pu expliquer la stabilité et l'expression à la membrane plus importantes d'EPOR FS, d'autant plus que le décalage du cadre de lecture cause la perte d'un résidu dileucine, site potentiel d'endocytose liée aux clathrines. Cependant, la mutation du motif dileucine dans le récepteur sauvage et dans le mutant EPOR STOP n'a eu d'impact ni sur l'expression à la surface cellulaire ni sur la sensibilité à l'EPO de ces récepteurs. De plus, l'étude de l'internalisation grâce à des expériences utilisant l'EPO-I125 n'a pas retrouvé de différence entre les différents récepteurs. La nouvelle séquence peptidique modifie également le résidu arginine en position 437. Un variant d'EPOR, p.Arg437His, a été décrit dans des cas d'érythrocytose. Il pourrait *a priori* s'agir d'un polymorphisme, mais il existe peu de données fonctionnelles [366] [395] [386]. Nous avons émis l'hypothèse que la modification de cet AA suite au décalage du cadre de lecture pourrait participer au phénotype d'hypersensibilité à l'EPO. Nous avons donc restauré, par mutagenèse dirigée dans le mutant EPOR FS, le résidu arginine en position 437. Ce mutant, EPOR FS-437, présentait une hypersensibilité à l'EPO mais diminuée par rapport à EPOR FS lors des tests de viabilité au WST-1. Cependant, son expression à la surface était semblable à celle d'EPOR FS.

Conclusion et perspectives

Nous avons donc étudié une nouvelle mutation constitutive d'EPOR, c.1300dupC (p.Gln434Profs*11), responsable d'un phénotype particulier chez une patient atteinte d'érythrocytose. En effet, si la présence d'une polyglobulie isolée associée à un taux sérique d'EPO bas est classique dans les érythrocytoses primitives [362] [364] [363] [381] [365] [355], la présence d'une pousse autonome des BFU-E est inhabituelle [362] [363] [364] [365] [366].

L'étude des cellules primaires et la modélisation dans la lignée cellulaire Ba/F3 ont mis en évidence une forte hypersensibilité à l'EPO, concordant avec la pousse autonome des BFU-E en cultures clonogéniques, ainsi qu'une activation spontanée et durable de STAT5 et de JAK2. Bien que la signalisation d'EPOR n'ait pas été étudiée pour toutes les mutations du récepteur décrites dans les EFP, il a été mis en évidence que deux mutants, EPOR

p.Gln434Cysfs*17fs et p.Ser412*, entraînaient une activation plus importante et plus durable de la voie JAK2/STAT5 comparée à EPOR WT [381] [386]. Seule EPOR p.412* provoquait une activation spontanée de STAT5 [386], ces derniers résultats ne sont cependant pas disponibles dans la publication. D'autre part, il n'est pas exclu que l'utilisation de chimères comprenant les parties extracellulaire et transmembranaire d'EGFR puisse modifier en elle-même la signalisation du récepteur EGFR-EPOR par rapport à EPOR, puisque la conformation du domaine transmembranaire est cruciale pour la pré-dimérisation d'EPOR et son activation par l'EPO [306] [307] [308] [78]. Quoiqu'il en soit, l'impact d'EPOR p.Gln434Profs*11 sur la signalisation est majeur et sans équivalence dans la littérature.

Une des hypothèses avancées dans la littérature pour expliquer le mécanisme des mutations d'EPOR dans les EFP repose sur la disparition de sites de régulation négative du signal et notamment des p-Tyr 454 et 456, sites de liaison à SHP-1, qui sont systématiquement perdus dans les mutations décrites [348] [349], y compris EPOR p.Gln434Profs*11. La perte du rétrocontrôle négatif entraînerait une activation anormale des voies de signalisation en aval et une hypersensibilité à l'EPO [381] [386]. Cependant, la persistance de la signalisation observée pour le mutant EPOR STOP ne suffisait pas dans notre étude à induire une hypersensibilité à la cytokine, contrairement à EPOR FS. Si le phénotype était dû à la perte de sites de régulation négative, donc à la seule présence d'un codon STOP prématuré, aucune différence entre les deux récepteurs mutés n'aurait dû être observée. L'hypersensibilité majeure mise en évidence pour EPOR p.Gln434Profs*11 est donc secondaire à la modification de la séquence peptidique due au décalage du cadre de lecture, par augmentation de la stabilité du récepteur à la membrane.

La seconde hypothèse avancée dans la littérature pour expliquer le phénotype des EFP, est celle d'un défaut d'internalisation secondaire à la perte des p-Tyr 454, 456 et 504, impliquées dans l'endocytose d'EPOR et donc sa dégradation par les lysosomes [345] [349]. Nous avons cependant écarté un défaut d'internalisation d'EPOR p.Gln434Profs*11, à la fois grâce à des expériences d'internalisation utilisant de l'EPO-I125, mais aussi par la restauration d'un motif dileucine, site potentiel d'endocytose liée aux clathrines, perdu dans la nouvelle séquence peptidique de notre mutant.

Nous avons ensuite étudié le rôle de la modification de l'arginine en position 437, remplacée par une alanine dans la nouvelle séquence du récepteur muté. En effet, la mutation EPOR p.Arg437His a été décrite dans des cas d'érythrocytoses [396] [387] [386]. Gross et al., par utilisation de chimère EGFR-EPOR, ont montré que cette mutation induisait une hypersensibilité à la cytokine lors de tests de viabilité type MTT, une persistance de la signalisation de la voie ERK après stimulation par l'EGF et une expression diminuée à la surface cellulaire, comparé à EPOR WT [386]. Nous avons donc restauré l'arginine en position 437 par mutagénèse dirigée dans le mutant EPOR FS. Une diminution de la réponse à l'EPO a été observée lors des tests de viabilité au WST-1, indiquant que la perte

de ce résidu est impliquée dans le phénotype d'hypersensibilité. La localisation d'EPOR FS-437 à la surface cellulaire était cependant identique à celle d'EPOR FS.

Aucune des hypothèses habituellement retenues sur le mécanisme des mutations d'EPOR dans les EFP (perte de sites de régulation négative du signal et d'internalisation) n'explique donc le phénotype particulier d'hypersensibilité majeure provoqué par EPOR p.Gln434Profs*11. La disparition du site de liaison de la β Trcp, E3 ligase responsable de la dégradation par le protéasome de la partie C-terminale du récepteur [303], pourrait expliquer l'activation prolongée du récepteur et l'hypersensibilité à l'EPO, comme mis en évidence par l'expression dans lignée Ba/F3 du mutant EPOR S462A [353]. D'autre part, EPOR p.Gln434Profs*11, par sa nouvelle séquence peptidique ou au décalage du cadre de lecture, pourrait induire des modifications conformationnelles particulières, stabilisant le récepteur muté à la membrane cellulaire, induisant sa pré-activation et celle de JAK2, ainsi qu'une signalisation spontanée et donc une hypersensibilité à l'EPO proche de celle des PV JAK2V617F. La modélisation informatique d'EPOR p.Gln434Profs*11 pourrait améliorer notre compréhension du mécanisme d'action de ce mutant.

Article 2 :

**Truncated erythropoietin receptor does not explain by
itself the development of erythrocytosis**

Truncated erythropoietin receptor does not explain by itself the development of erythrocytosis

Florence Pasquier^{1,2,3,4}, **Caroline Marty**^{1,2,3,4}, **Frédérique Verdier**⁵, **Sarah Grosjean**^{1,2,3,4}, **Claude Préhu**⁶, **Stefan N Constantinescu**⁷, **Nicole Casadevall**^{1,8}, **William Vainchenker**^{1,2,3,4}, **Christine Bellanné-Chantelot**^{1,2,3,9}, **Isabelle Plo**^{1,2,3,4}

- 1- INSERM, UMR 1170, Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif, France
- 2- Université Paris XI, UMR 1170, Gustave Roussy, Villejuif, France
- 3- Gustave Roussy, Villejuif, France
- 4- Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif, France
- 5- Institut Cochin, INSERM, U1016, Paris, France.
- 6- INSERM U468, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France
- 7- Ludwig Institute for Cancer Research and de Duve Institute, Université catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium
- 8-Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Laboratoire d'hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France
- 9-Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Département de Génétique, Hôpital la Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Running title: New EPOR mutation in erythrocytosis

Corresponding authors: Isabelle Plo

UMR U1170, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif,
isabelle.plo@gustaveroussy.fr

Total word count:

Keywords: EPOR truncation, JAK2, erythrocytosis, EPO

ABSTRACT

Erythrocytosis is a non-malignant disease characterized by an elevated red cell mass. Around twenty constitutional mutations of erythropoietin receptor (*EPOR*) have been described, leading to truncated receptor. We identified in a patient with congenital erythrocytosis a new heterozygous frameshift *EPOR* mutation, c.1300dupC (p.Gln434Profs*11), leading to modification of 11 amino acids and a premature stop codon. The goal of this work was to decipher the mechanism involved in the erythrocytosis phenotype. Studies on primary cells showed that erythroblasts from patients displayed strong hypersensitivity to EPO, and a spontaneous and persistent STAT5 activation compared to control. We then modeled either the *EPOR* WT (*EPOR* WT) or a truncated receptor at 444 position (*EPOR**) or the frameshift *EPOR* mutation, mimicking the patient (*EPOR* FS) in the Ba/F3 cell line. We found that *EPOR* FS mutant induced hypersensitivity to EPO, comparable to that observed in primary cells, while the *EPOR** had no impact. This was concomitant with a marked spontaneous and persistent STAT5 activation for *EPOR* FS probably due to longer half-life, higher basal expression at the cell-surface membrane. These results indicate that *EPOR* truncation is not sufficient to induce the erythrocytosis phenotype but also requires the new sequence of 11 AA.

Key Points:

- New heterozygous *EPOR* mutation c.1300dupC in congenital erythrocytosis
- EPO hypersensitivity is not due to *EPOR* truncation alone.

INTRODUCTION

Erythrocytosis is a rare entity characterized by an increased red cell mass, considered as non-malignant disease in contrast to Polycythemia Vera (PV), due to the polyclonal nature of hematopoiesis without progression to myelofibrosis or acutisation.

Familial or congenital erythrocytosis are inherited disorders with autosomal dominant pattern and early onset (complete penetrance) of the hematological abnormality. They are heterogeneous disorders that could be classified in two categories depending on erythropoietin (EPO) serum level. Primary erythrocytosis also called PFCP (primary familial or congenital polycythemia) displayed subnormal EPO level, whereas secondary erythrocytosis often present increased EPO levels due defects in the oxygen sensing pathway. In the first case, the molecular abnormalities correspond to mutations in erythropoietin receptor (*EPOR*) and more than twenty constitutional mutations of *EPOR* (exon 8) have been described leading to truncated receptor in the C-terminal part of the protein¹⁻⁴. No mutation found in sporadic PV such as *JAK2V617F* or *JAK2*exon 12 are present. In the second case, the polycythemia are secondary due to genetic abnormalities in α - or β -globin or 2,3-bisphosphoglycerate mutase leading to higher oxygen affinity or directly in molecules controlling oxygen sensing pathway such as mutations in *PHD2*, *VHL*, *HIF-2a*⁵.

Here, we report a patient with congenital erythrocytosis carrying so far unidentified heterozygous germline mutations in *EPOR* c.1300dupC (Gln434Profs*11). This mutant displays a gain-of-function activity and a high hypersensitivity to EPO similarly to *JAK2V617F*-positive PV. Through modeling of different *EPOR* mutants into Ba/F3 cell lines, we showed that truncation of the receptor was not sufficient to induce EPO hypersensitivity but rather due to stabilized *EPOR* at cell-surface membrane leading to spontaneous activation of *EPOR*-induced signaling pathways.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Human recombinant EPO and IL-3 were generous gifts from Amgen (Neuilly, France). SCF was from Biovitrum AB (Stockholm, Sweden). Restriction enzymes were purchased from Fermentas (St Leon-Rot, Germany).

Patients, cell purification and erythroblasts cultures

Peripheral blood samples from the patient or donors were collected from leukapheresis. Local Research Ethics Committee from la Pitié-Salpêtrière hospital approved this study and informed consent was obtained from patients in accordance to the Declaration of Helsinki. Mononuclear cells were separated over a Ficoll density gradient and CD34⁺ cells were purified by a double-positive magnetic cell sorting system (AutoMACS; Miltenyi Biotec, Auburn, CA). CD34⁺ cells were amplified in erythroid conditions for 7-10 days in Iscove modified Dulbecco medium with penicillin/streptomycin/glutamine, alpha-thioglycerol, BSA, a mixture of sonicated lipids, and insulin-transferrin in the presence of 3 recombinant human cytokines (25 ng/mL SCF, 100 U/mL IL-3, 1 U/mL EPO).

Quantification of clonogenic progenitors in semi-solid cultures

Colony assay was performed with 500 purified CD34⁺ progenitors per culture dish in duplicate in H4100 Methocult media (StemCell) supplemented with 12% BSA, 37% or no fetal bovine serum, 2-β-mercaptoethanol (1μM), 1% L-glutamine, SCF (25 ng/mL), IL3 (100 U/mL) and in absence or presence of increasing EPO concentrations. Burst-forming units-erythroid (BFU-E) or granulomonocytic (CFU-GM) progenitors were counted after 14 days in culture. ⁶

DNA manipulations, retroviruses production

The c.1300dupC (Gln434Profs*11) *EPOR* mutation (EPOR FS) or 1330G>T (E444*) nonsense *EPOR* mutation (EPOR STOP) or 1303C>G and 1304T>C (L435A) missense dileucine *EPOR* mutation

(EPOR WTdiL or EPOR STOPdiL) or 1309-1310 GC>CG (EPOR FS A437R) were introduced into the pMX-HA-humanEPOR-IRES-GFP plasmid by the QuikChange site-directed mutagenesis method using the PfuUltra high-fidelity DNA polymerase (Stratagene Amsterdam, The Netherlands). Full-length *EPOR* mutant cDNAs were verified by sequencing.

Cell lines

The murine pro-B Ba/F3 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Stem Cell Technologies, Grenoble, France) and 5% WEHI-conditioned medium as a source of murine IL-3. Ba/F3 cells were retrovirally transduced with pMX-IRES-GFP to stably express the human EPOR wild-type or mutants EPOR, carrying a N-terminal HA-tag. Ba/F3-EPOR GFP⁺ cells were subsequently sorted by flow cytometry (MoFlo, Beckman-Coulter, Villepinte, France).

Proliferation assays.

The premixed WST-1 cell proliferation assay system was carried out according to manufacturer's instructions (Takara Bio Europe, Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France). Dose-response curves to EPO were expressed as percentage of viability of the maximal response. The 50% inhibitory concentration (IC50) was calculated using GraphPad PRISM software.

Western blot analysis

Signaling studies were performed by Western blot analysis using polyclonal antibodies against the phosphorylated forms of JAK2 (Tyr 1007/1008), STAT5 (Tyr 694), ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) and AKT1 (Ser 473) and against the pan proteins (Cell Signaling Technology (Ozyme)). β -actin (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was used as loading controls.

EPOR signaling and length of STAT5 phosphorylation

Ba/F3 cells were cultured in DMEM without serum or cytokines for 5 hours. For dose-response to EPO, cells were then collected and incubated with increasing EPO concentrations for 15 minutes. To study the dephosphorylation of STAT5, cells were stimulated with EPO 1U/ml for 15 minutes, washed

in PBS 1X and cultured in DMEM without serum or cytokines. Cells were collected at different time of the assay.

Western blots were performed using polyclonal antibodies against pSTAT1, pSTAT3, pSTAT5, pAKT, pERK, STAT1, STAT3, STAT5, AKT and ERK (Cell signalling Technology, Ozyme). β -actin was used as loading control.

Degradation assay

Ba/F3 cells were incubated for different times intervals with 50ng/ml cycloheximide (CHX) (Sigma, Saint Louis, USA). After lysate, Western blot were performed with anti-HA antibody. Quantification of HA-EPOR was done with Image J Software, using β -actin as loading control. The half-life of the receptor was calculated using GraphPad PRISM software.

Cell-surface expression of HA-tagged EPOR by flow cytometry

Cells were labeled with monoclonal mouse anti-HA antibody coupled with PE (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) and processed by flow cytometry (MoFlo, Beckman-Coulter, Villepinte, France). Data were analyzed with Flow Jo software.

EPO labeling, EPO binding and EPO internalization studies

EPO labeling using IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL), EPO binding and EPO internalization studies were performed as previously described^{7,8}. A saturating ¹²⁵I-EPO concentration (1 nM; 2 U/mL) was used for these experiments to suppress the effects of putative modifications of EPOR affinity induced by the different inhibitors used. Nonspecific binding, determined using a 250-fold excess of unlabeled EPO, was less than 5% in each case. All reported data represent specific binding. For cell surface expression, radioactivity of Ba/F3 cells was compared to UT-7 radioactivity in order to determine the number of cell-surface receptors. In internalization experiments, we performed an acidic wash to separate cell surface-bound and internalized EPO. After incubation with ¹²⁵I-EPO, the cells were washed twice at 4°C to remove unbound ligand. They were incubated in 0.5 mL acidic buffer (NaCl 150 mM, sodium acetate 50 mM, pH 3.5) for 3 minutes at 4°C. The pH was then adjusted to 7.4 using

1 M Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)–HCl, pH 9, and the cell suspension was centrifuged. Radioactivities of the supernatant (cell surface–bound EPO) and of the cell pellet (internalized EPO) were determined. When ^{125}I -EPO was bound to the cells at 4°C to inhibit EPO internalization, more than 95% of cell-bound ^{125}I -EPO was recovered in the acidic wash supernatant using this method. Each experiment was performed 3 times with similar results.

RESULTS

Identification of a new *EPOR* mutant in a patient displaying erythrocytosis

A 28 year-old woman, with no medical history, particularly thromboembolism, was diagnosed in 1993 as a polycythemia since she presented high hemoglobin concentration and hematocrit (21 g/dL and 60%, respectively), whereas leukocytes and platelets counts were normal. The measurement of isotopic corpuscular volume confirmed the true polycythemia with an increase of 65% of the cell volume. Clinical examination did not detect hepato-splenomegaly. Bone marrow aspiration and biopsy were strictly normal. EPO serum level was decreased (1.2 mU/mL; laboratory standards: 5-25 mU/mL) and causes of secondary polycythemia have been rejected (blood gases, renal ultrasound and brain scan). In addition, *JAK2V617F*, *JAK2* exon 12 mutations but also *VHL* and *PHD1/2* mutations were negative. However, sequencing of *EPOR* gene in all hematopoietic cells such as polynuclear neutrophils (PNN), whole blood cells or CD3⁺ T cells as well as in cells from other tissues including nails, hair and buccal swab, identified a constitutive heterozygous frameshift mutation, c.1300dupC (p.Gln434Profs*11) (Figure 1A), allowing the diagnosis of a congenital erythrocytosis.

Moreover, the culture of the erythroblast progenitors highlighted a major cell autonomous growth in the presence of serum and a nearly 5-fold increase in EPO hypersensitivity with larger colonies compared to normal donors without serum (Figure 1B and C) and comparable to PV patients⁹. To better understand the mechanism of *EPOR* truncation mutants and since very few mechanistic works has been performed in primary cells from erythrocytosis patients, we cultured CD34⁺ progenitors *in vitro* in presence of IL-3, SCF and EPO and performed signaling studies on patient or control donor erythroblasts. A strong constitutive phosphorylation of JAK2 and STAT5 was

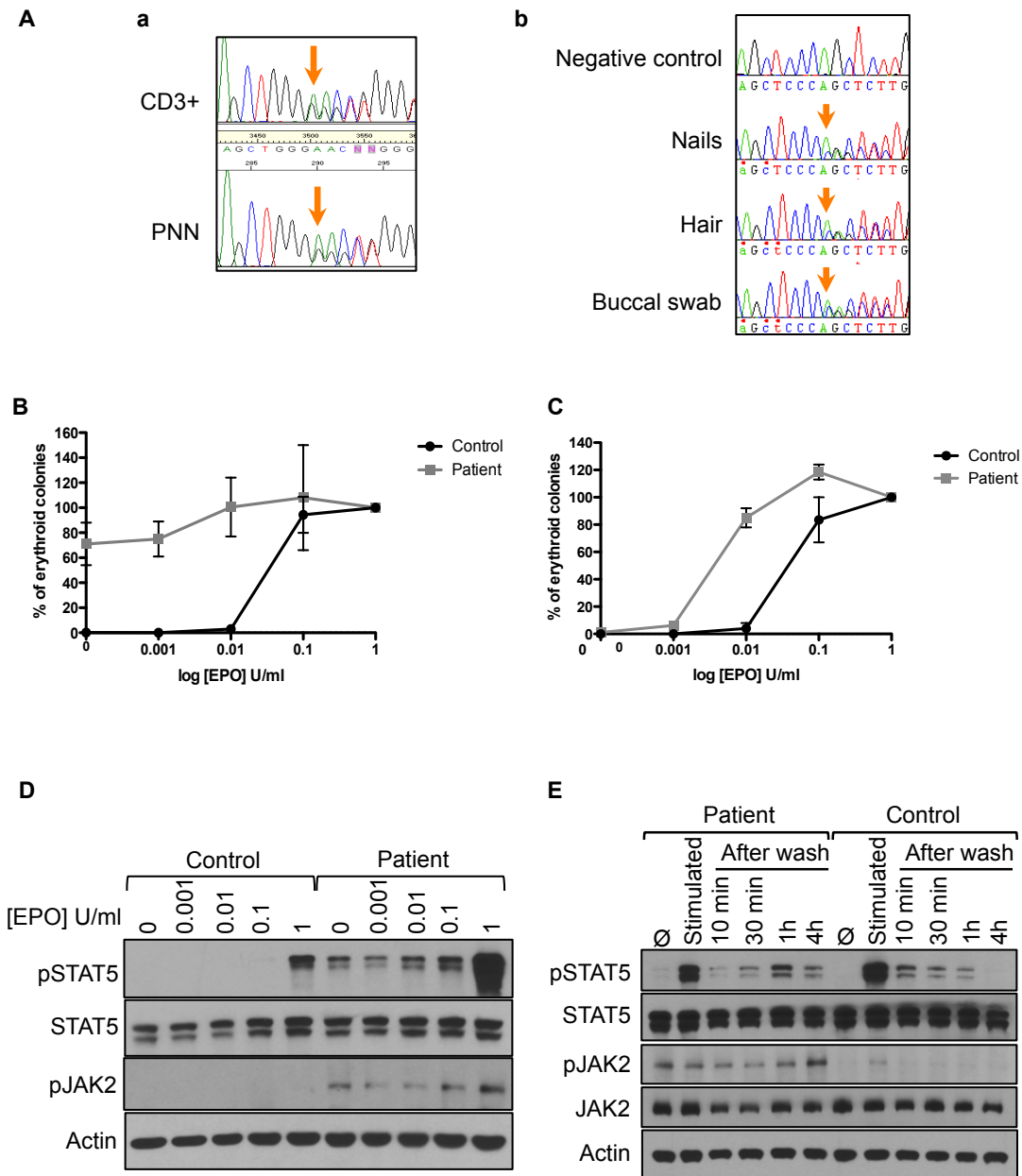


Fig 1: Study of the *EPOR* c.1300dupC (Gln434Profs*11) in primary cells

(A) Sequence electropherograms of *EPOR* c.1300dupC mutation: a) in hematopoietic cells (T CD3⁺ lymphocytes and neutrophils), b) in non hematopoietic tissues (nails, hair and buccal swab). (B) Erythroid progenitors (BFU-E) sensitivity to EPO. CD34⁺ cells from the patient or donor were cultured in duplicate in semi-solid medium in presence of fetal bovine serum, SCF and IL3, with increasing doses of EPO (0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 and 1 U/ml). Erythroid colony formation was counted at day 14. Each experiment was performed twice. (C) The same experiment was performed in absence of fetal bovine serum. (D) Signaling studies of erythroblasts. CD34⁺ cells from the patient or donor were cultured in presence of SCF, IL3 and EPO for 7 days. Cells were then serum- and cytokine- starved for 5 hours prior to a 15-min stimulation either in absence of EPO or with increasing doses of EPO (0.001, 0.01, 0.1 and 1 U/mL EPO) at 37°C. Cells were lysed and the phosphorylation status of STAT5 and JAK2 was examined by western blotting with the respective anti-phospho specific antibodies. Blots shown were reproduced in 3 independent experiments. (E) Persistence of signaling. CD34⁺ cells from the patient or donor were cultured in presence of SCF, IL3 and EPO for 7 days. Cells were then serum- and cytokine- starved for 5 hours prior to a 15-minute stimulation with 1 U/ml EPO. EPO was then washed out and STAT5 and JAK2 phosphorylations were examined in a time dependent manner by western blotting. Blots shown were reproduced in 2 independent experiments.

observed in the patient erythroblasts (Figure 1D). Moreover, cells from the patient showed a persistent JAK2 and STAT5 phosphorylation for 5 hours, even after EPO removal, while control cells were quickly dephosphorylated (Figure 1E).

Our results show that this EPOR truncation mutation induces a strong EPO hypersensitivity in primary cells and constitutive and persistent JAK2/STAT5 activations¹⁰.

Functional analysis of the EPOR mutant

To decipher the mechanism of this EPOR mutant, we modeled in the Ba/F3 cell line different constructs with retrovirus containing GFP, encoding either the HA-tagged EPOR WT (*EPOR WT*) or a truncated receptor at position 444 (*EPOR STOP*) or the frameshift *EPOR* mutation, mimicking the patient (*EPOR FS*) (Figure 2A). We first measured the impact of these mutants on cellular proliferation in response to EPO using MTT-like assays. Strikingly, *EPOR FS* but not *EPOR STOP* conferred a 4- to 5-fold hypersensitivity to EPO compared to *EPOR WT* (IC₅₀ of 0.003 U/mL for *EPOR FS* and 0.01 U/mL for *EPOR WT* and *STOP*) (Figure 2B). However, no spontaneous growth was detected with *EPOR FS* when cultured in the absence of cytokines. The effect of *EPOR STOP* and *EPOR FS* mutants was investigated on signaling by western-blot analysis with increasing doses of EPO. Noticeably, these cells expressed similar levels of endogenous EPOR detected with anti-HA antibody (Figure 2C). A constitutive phosphorylation of STAT5, AKT and ERK were observed in *EPOR FS* mutant cells and, at a lesser extent, in *EPOR STOP*, compared with *EPOR WT* cells (Figure 2C). Moreover, *EPOR FS* and *EPOR STOP* mutant cells showed a persistent STAT5 phosphorylation after EPO removal (up to 4 hours for *EPOR FS* and to 2 hours for *EPOR STOP*) compared to a rapid dephosphorylation in control cells (Figure 2D), suggesting that molecules negatively regulating the signal are partially involved in the EPO hypersensitivity phenotype.

Together, these results show that *EPOR FS* is a gain-of-function mutation leading to strong EPO hypersensitivity and spontaneous and persistent activation of STAT5 in Ba/F3 cell lines.

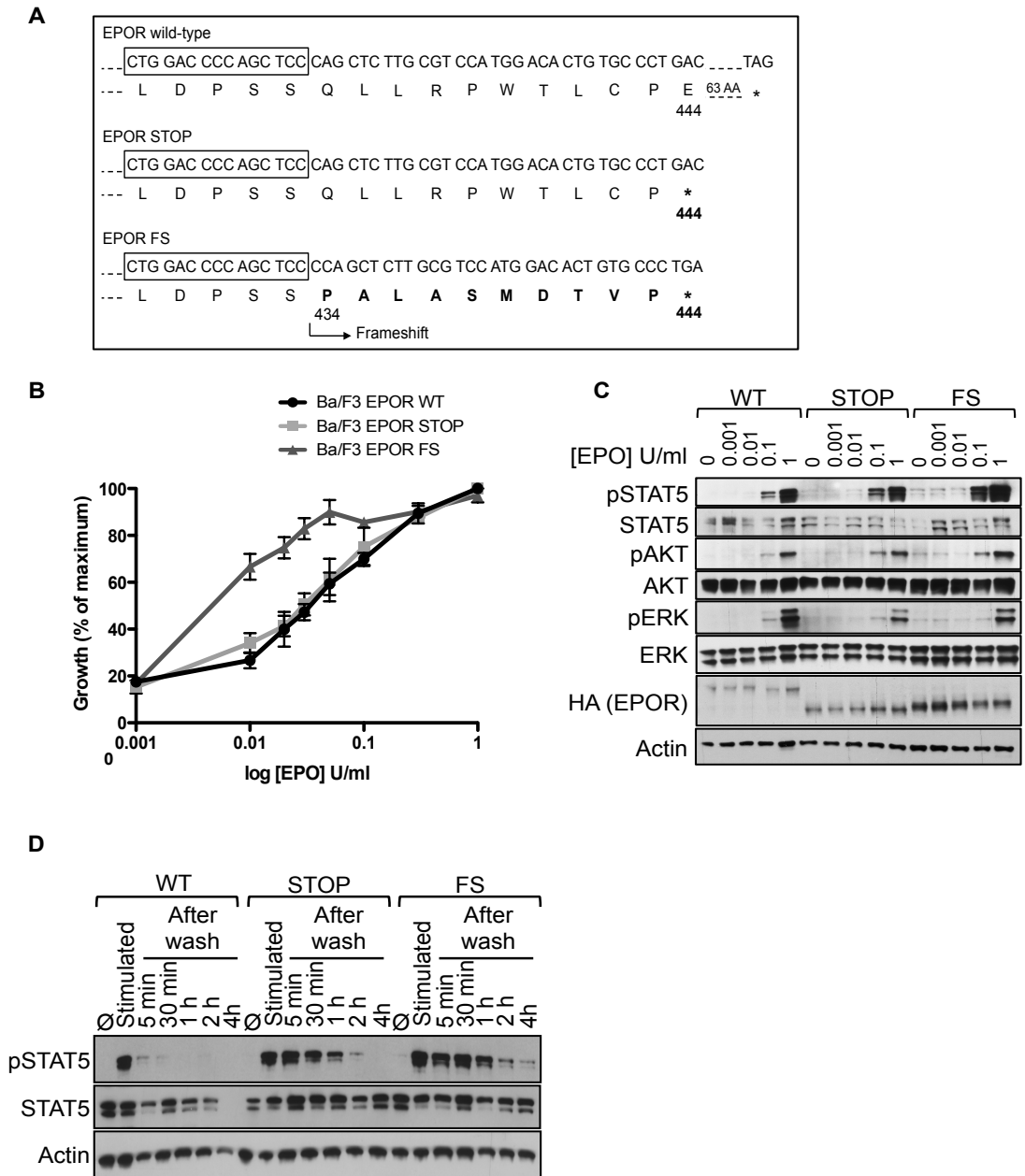


Fig 2: Functional study of EPOR FS in Ba/F3 cell line (A) Ba/F3 cells were retrovirally transduced with MIGR-IRES-GFP to stably expressed three different human HA-tagged EPORs: wild-type EPOR (WT), EPOR Gln434* (STOP) and EPOR Gln434Profs*11 (FS). (B) Proliferation response to EPO: Ba/F3-EPOR cells expressing each of the EPOR forms were cultured for 72 hours either in the absence of cytokine or in the presence of increasing doses of EPO (0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.3, and 1 U/mL). Viable cells were quantified by WST-1 proliferation assay. Dose-response curves are means expressed in percentages of maximum growth value (SEM; n = 3 in triplicate). Two-tailed *t*-test, * <0.05 **, $p<0.01$. (C) Signaling studies. Ba/F3-EPOR cells were serum- and cytokine- starved for 5 hours prior to a 15-minute stimulation either in the absence of cytokine or with increasing doses of EPO (0.001, 0.01, 0.1 and 1 U/mL EPO) at 37°C. Cells were lysed and the phosphorylation status of STAT5, AKT and ERK1/2 was examined by western blotting with the respective anti-phospho specific antibodies. HA antibody was used to examine EPOR expression level. Blots shown were reproduced in 2 independent experiments. (D) Persistence of signaling. Ba/F3-EPOR cells were serum- and cytokine- starved for 5 hours prior to a 15-minute stimulation with 1 U/ml EPO. EPO was then washed out and the STAT5 phosphorylation was examined by western blotting in a time dependent manner. Blots shown were reproduced in 2 independent experiments.

Mechanisms induced by the EPOR mutant

To understand signaling differences and subsequent EPO sensitivity of EPOR FS and STOP mutants, we checked the stability of the EPOR WT or mutants with cycloheximide. As shown in Figure 3A, EPOR FS protein was more stable than EPOR STOP and EPOR WT with half-lives of 120 and 60 minutes, respectively. Consequently, we also examined cell-surface expression of EPOR WT or mutants by flow cytometry analysis at similar GFP levels and observed more than 2 fold increased in EPOR FS compared to similar levels of EPOR WT and STOP (Figure 3B), further confirmed with radiolabeled ^{125}I -EPO (856 \pm 64 and 1026 \pm 30 receptors for STOP and WT and 2168 \pm 364 receptors for FS). These results suggest either an increased trafficking or a decreased internalization of EPOR FS. Decreased internalization was investigated with ^{125}I -EPO and cytometry analysis and showed that EPOR FS have no impact on internalization (Figure 3C). Moreover, to know if the new terminal sequence in EPOR FS could be involved in increased cell-surface expression compared to EPOR STOP, we hypothesized whether a dileucine motif, even if it was not conventional, might be involved in clathrin-mediated EPOR endocytosis. We generated EPOR WT/diL and EPOR STOP/diL mutants (Figure 4A). None of the mutant changed EPO sensitivity, signaling or cell-surface expression compared to their counterpart (Figure 4 B, C and D).

Together, these results showed that EPOR FS hypersensitivity was not due defect in internalization or to abrogation of the dileucine motif.

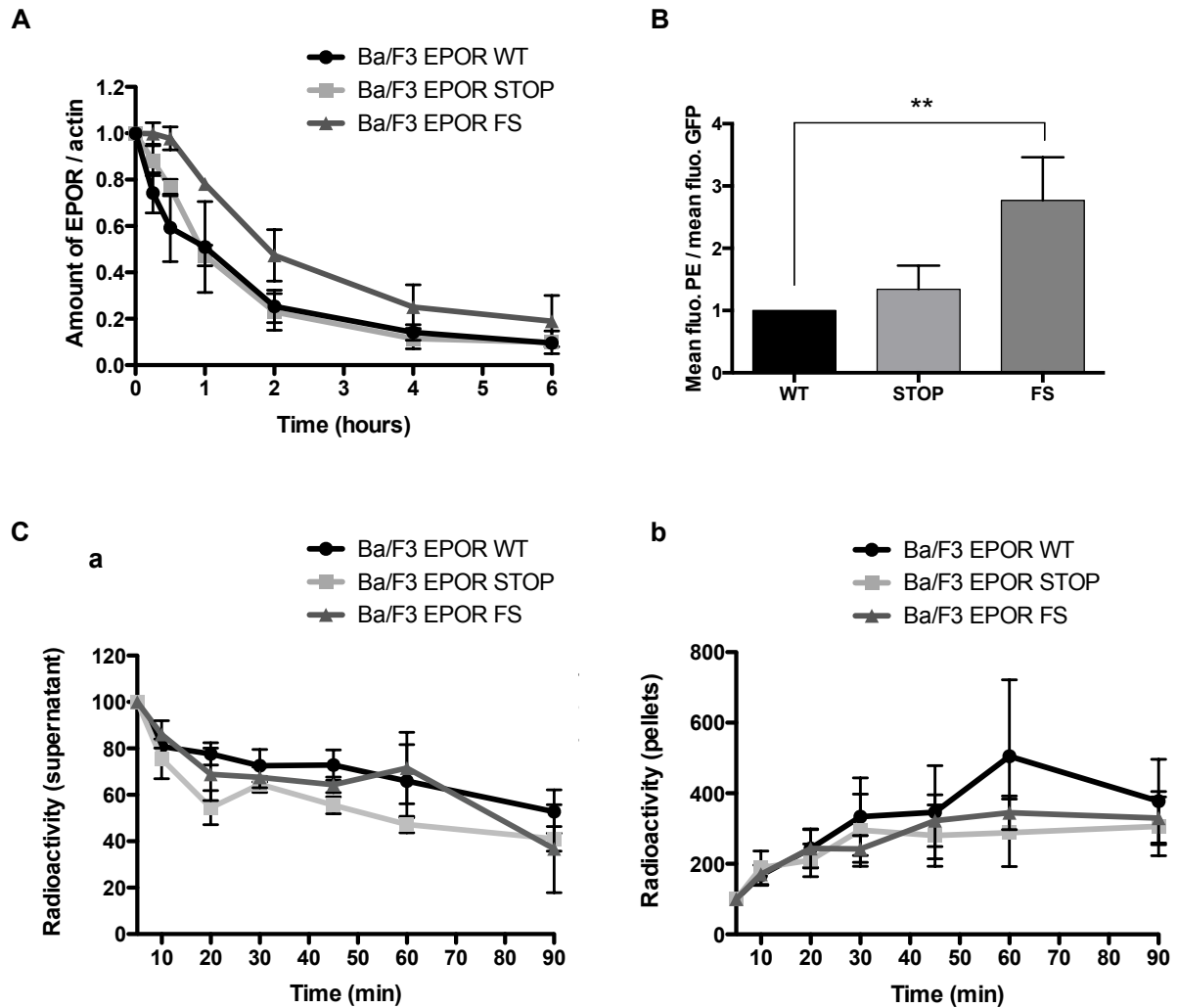


Fig 3: Mechanisms induced by EPOR FS in Ba/F3 cell line

(A) EPOR stability. Ba/F3-EPOR cells were incubated in cycloheximide and HA expression was studied by western blotting. A quantification of the HA-EPOR and β -actin was performed using Image J software. The curves represent the HA/ β -actin ratios. Two independent experiments were done. (B) EPOR cell-surface expression. EPOR cell-surface expression was assessed by flow cytometry using PE fluorescence labeling of the extracellular HA tag. Histogram shows the ratio of mean fluorescence intensities (MFIs) of PE-labeled cell-surface EPO on their respective MFIs of GFP. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (C) EPOR internalization was performed with radiolabeled ^{125}I -EPO. Cells were incubated with ^{125}I -EPO and washed at 4°C to remove unbound ligand. An acidic wash was then performed to separate cell surface-bound and internalized EPO. The radioactivities of the supernatant (cell surface-bound EPO) and of the cell pellet (internalized EPO) were determined. Each experiment was performed 3 times with similar results.

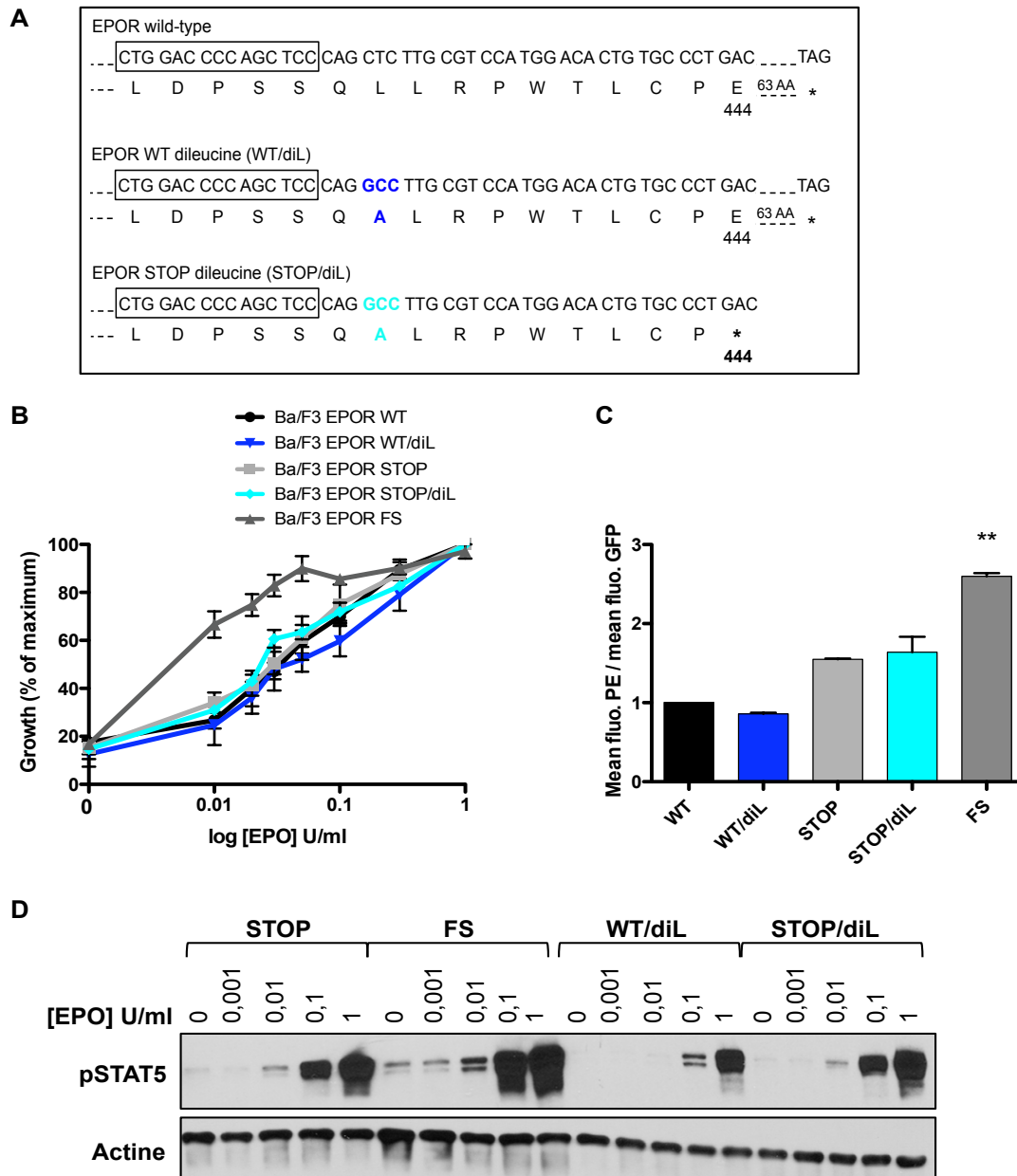


Fig 4: Role of dileucine motif defect in EPOR FS function

(A) Ba/F3 cells were retrovirally transduced with MIGR-IRES-GFP to stably expressed different human HA-tagged EPORs: wild-type EPOR (WT) or missense dileucine *EPOR* mutation (EPOR WTdiL), EPOR STOP or EPOR STOPdiL and EPOR FS. (B) Proliferation response to EPO: Ba/F3-EPOR cells expressing each of the EPOR forms were cultured for 72 hours either in the absence of cytokine or in the presence of increasing doses of EPO (0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.3, and 1 U/mL). Viable cells were quantified by WST-1 proliferation assay. Dose-response curves are means expressed in percentages of maximum growth value (SEM; n = 3 in triplicate). Two-tailed *t*-test, $* < 0.05$, $** < 0.01$. (C) EPOR cell-surface expression. EPOR cell-surface expression was assessed by flow cytometry using PE fluorescence labeling of the extracellular HA tag. Histogram shows the ratio of mean fluorescence intensities (MFIs) of PE-labeled cell-surface EPO on their respective MFIs of GFP. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. (D) Signaling studies. Ba/F3-EPOR cells were serum- and cytokine- starved for 5 hours prior to a 15-minute stimulation either in the absence of cytokine or with increasing doses of EPO (0.001, 0.01, 0.1 and 1 U/mL EPO) at 37°C. Cells were lysed and the phosphorylation status of STAT5 was examined by western blotting with the respective anti-phospho specific antibody.

Role of A437R residue change in the new terminal tail of EPOR FS mutant

R437 amino acid residue has previously been reported mutated R437H in a case of erythrocytosis ¹¹. We have also identified a family displaying familial polycythemia carrying such variant with an autosomal transmission but incomplete penetrance (Figure 5A). R437H is described as a polymorphism in dbSNP (138): rs62638744 and in ESP (ESP6500SIV2): Eur. Am.: T=0.07% - Afr. Am.: T=0.52%. R437 acid is weakly conserved across species and *in silico* analysis of the potential impact of this amino acid substitution predicted a non-pathogenic effect on EPOR function. Since R437 is changed into an arginine in the new terminal tail of the EPOR FS, we asked whether it could modulate or modify the phenotype of this mutant. We generated a mutant EPOR FS in which the R437 amino acid residue was restored (Figure 5B). We tested EPO sensitivity and cell-surface expression compared to its counterpart, EPOR FS, and EPOR WT (Figure 5 C,D). Interestingly, EPO FS-437 inhibited by 3 times the EPO hypersensitivity compared to EPOR FS. However, this mutant was expressed similarly to EPOR FS at the cell-surface. These results suggest that R437 is an important residue for the EPOR FS-induced EPO hypersensitivity.

DISCUSSION

In this study, we have identified a new *EPOR* mutation (EPOR p.Gln434Profs*11) (EPOR FS) responsible for the erythrocytosis. This mutation leads to a 65 AA truncation of EPOR including a new C-terminal tail of 11AA. Other mutations at the same position but leading to stop codon such as p.Gln434* or to different AA such as p.Gln434Cysfs*17 have been identified nearby.^{4,12,13} Our results showed that this EPOR mutation induced a great hypersensitivity to EPO, comparable to what is observed with some JAK2V617F-positive PV ⁶ and are in agreement with EPO hypersensitivity found in primary cells with *EPOR* truncation mutations. We found that EPOR FS induced a spontaneous and persistent activation of JAK2/STAT5, either in day-10 erythroblasts derived from primary patient's cells and in Ba/F3 cell lines, according to what is described in cell lines or primary erythroblasts from patients.^{10,14}

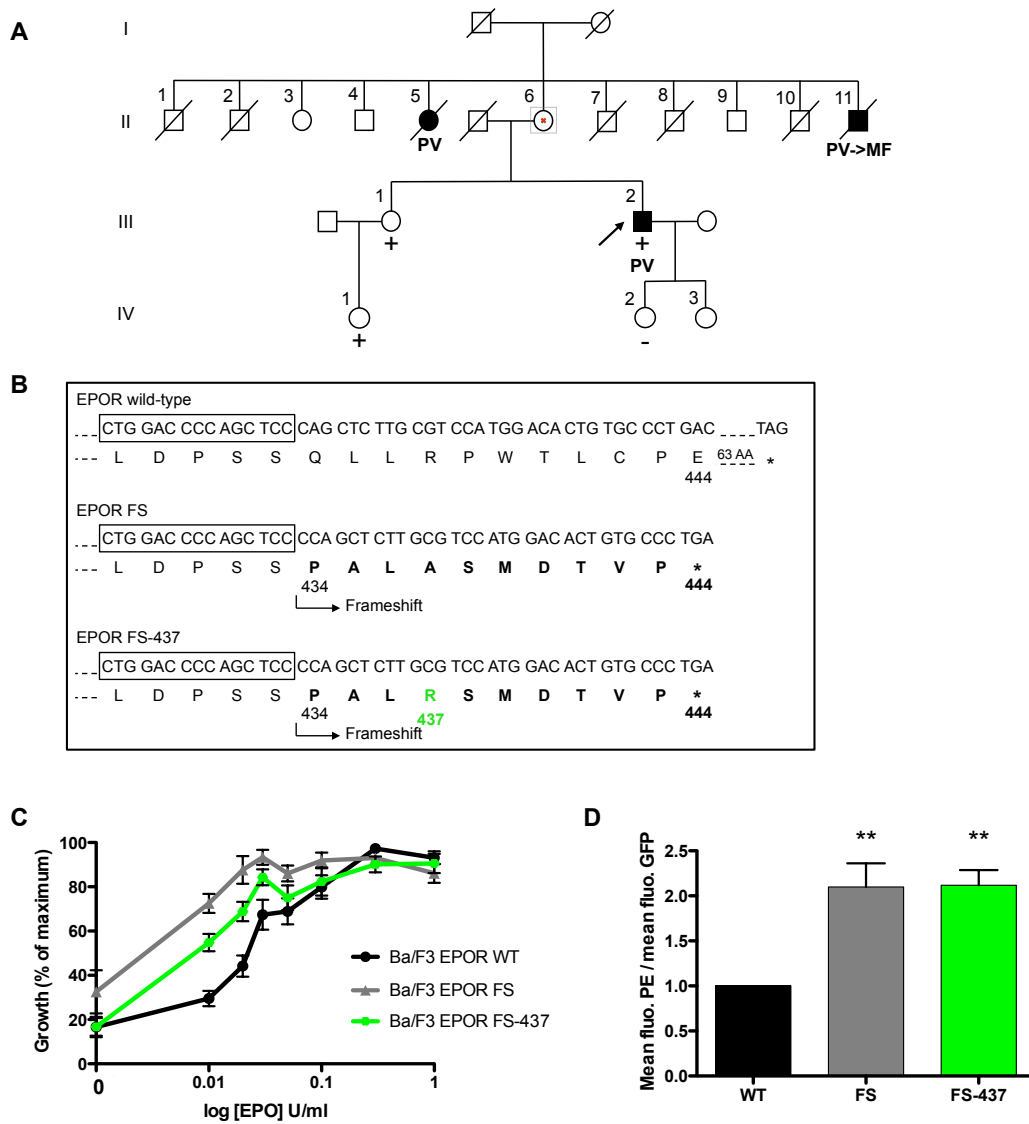


Fig 5: Role of R437 change in EPOR FS function

(A) Pedigree of a polycythemia family with EPOR R437H mutation. (B) Ba/F3 cells were retrovirally transduced with MIGR-IRES-GFP to stably expressed different human HA-tagged EPORs: EPOR FS or EPOR FS-437 with a restored arginine in position 437. (C) Proliferation response to EPO: Ba/F3-EPOR cells expressing each of the EPOR forms were cultured for 72 hours either in the absence of cytokine or in the presence of increasing doses of EPO (0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.3, and 1 U/mL). Viable cells were quantified by WST-1 proliferation assay. Dose-response curves are means expressed in percentages of maximum growth value (SEM; n = 3 in triplicate). Two-tailed *t*-test, * <0.05 **, $p < 0.01$. (D) EPOR on cell-surface expression. EPOR cell-surface expression was assessed by flow cytometry using PE fluorescence labeling of the extracellular HA tag. Histogram shows the ratio of mean fluorescence intensities (MFIs) of PE-labeled cell-surface EPO on their respective MFIs of GFP. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

To better decipher the mechanism of this EPOR FS-induced hypersensitivity, we modeled different mutants in Ba/F3 cell lines. Only EPOR FS gave hypersensitivity to EPO and displayed a constitutive signaling activation, in contrast to EPOR STOP. EPOR STOP and EPOR FS cells showed a persistent STAT5 phosphorylation after EPO removal, showing that EPOR truncation and thus molecules negatively regulating the signal are not involved in the EPO hypersensitivity.

Higher expression at cell-surface membrane and stability for EPOR FS than for EPOR WT were found, suggesting increased trafficking or decreased internalization of EPOR FS, as suggested by some studies using EGFR-EPOR chimeric truncated mutant receptors^{10,14}. In contrast, our investigations did not reveal any differences in the EPOR internalization process and abrogation of diL in the EPOR STOP mutant did not show any increased EPO hypersensitivity. These results are in agreement with previous study showing that internalization is not impacted in EPOR mutant deleted till the amino acid E346.¹⁵

We examined the potential implication of R437 in the sensitivity to EPO since this amino acid has been related to erythrocytosis patients in the literature. R437 did not modify the receptor cell-surface expression but seems to be involved in EPO hypersensitivity.

Altogether, these results show that the truncated form of EPOR is responsible for slowest dephosphorylation of the EPOR while the major hypersensitivity to EPO observed in primary cells is due to the new sequence of 11 AA. The latter by increasing the EPOR stability to the membrane may cause the pre-activation of both receptor and JAK2, spontaneous signaling and hypersensitivity to EPO, close to that of PV JAK2V617F.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank a lot the patient involved in the study. We thank the cytometry platform of Gustave Roussy (P. Rameau and Y. Lecluse).

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JVSV1-GERMPN-01), GIS-Institute for rare diseases for high throughput sequencing (AO9102LS), Association de recherche sur la moelle osseuse (ARMO) and from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (Fondation ARC libre 2012) and regional PHRC AOR07014. Labex GR-Ex (IP, WV) is funded by the program “Investissements d’avenir”. FP was supported by Ph.D grants from the ARC. CM was supported by ANR-Blanc 2013 GERMPN. WV are recipients of a research fellowship from IGR INSERM (contrats d’interface).

Contribution: IP, CBC designed and performed research, analyzed data, prepared figures; NC was involved in clinical data; FP performed research primary cells and cell lines; CP performed EPOR sequencing; CM and SG performed Western blot and cell viability test; WV designed work, analyzed data and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Bento C, Percy MJ, Gardie B, et al. Genetic basis of congenital erythrocytosis: mutation update and online databases. *Human mutation*. 2014;35(1):15-26.
2. de la Chapelle A, Traskelin AL, Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(10):4495-4499.
3. Furukawa T, Narita M, Sakaue M, et al. Primary familial polycythaemia associated with a novel point mutation in the erythropoietin receptor. *British journal of haematology*. 1997;99(1):222-227.
4. Kralovics R, Indrak K, Stopka T, Berman BW, Prchal JF, Prchal JT. Two new EPO receptor mutations: truncated EPO receptors are most frequently associated with primary familial and congenital polycythemia. *Blood*. 1997;90(5):2057-2061.

5. Bento C, Almeida H, Fernandez-Lago C, Ribeiro ML. Primary familial congenital erythrocytosis: two novel EPOR mutations found in Spain. *International journal of laboratory hematology*. 2013;35(5):e27-28.
6. Dupont S, Masse A, James C, et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;110(3):1013-1021.
7. Verdier F, Walrafen P, Hubert N, et al. Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J Biol Chem*. 2000;275(24):18375-18381.
8. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chretien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood*. 2005;105(2):600-608.
9. James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends in molecular medicine*. 2005;11(12):546-554.
10. Perrotta S, Cucciolla V, Ferraro M, et al. EPO receptor gain-of-function causes hereditary polycythemia, alters CD34 cell differentiation and increases circulating endothelial precursors. *PloS one*. 2010;5(8):e12015.
11. Chauveau A, Luque Paz D, Lecucq L, et al. A new point mutation in EPOR inducing a short deletion in congenital erythrocytosis. *British journal of haematology*. 2015.
12. Arcasoy MO, Degar BA, Harris KW, Forget BG. Familial erythrocytosis associated with a short deletion in the erythropoietin receptor gene. *Blood*. 1997;89(12):4628-4635.
13. Arcasoy MO, Harris KW, Forget BG. A human erythropoietin receptor gene mutant causing familial erythrocytosis is associated with deregulation of the rates of Jak2 and Stat5 inactivation. *Experimental hematology*. 1999;27(1):63-74.
14. Gross M, Ben-Califa N, McMullin MF, et al. Polycythaemia-inducing mutations in the erythropoietin receptor (EPOR): mechanism and function as elucidated by epidermal growth factor receptor-EPOR chimeras. *British journal of haematology*. 2014;165(4):519-528.
15. Beckman DL, Lin LL, Quinones ME, Longmore GD. Activation of the erythropoietin receptor is not required for internalization of bound erythropoietin. *Blood*. 1999;94(8):2667-2675.

Résultats 2 :
Prédisposition aux NMP : étude d'EPOR p.Pro488Ser

Contexte et objectifs du travail

Plusieurs cas familiaux de NMP de transmission le plus souvent AD à pénétrance incomplète ont été rapportés dans la littérature [219] [220] [218]. Ces agrégations familiales, l'augmentation du risque de développer un NMP pour les apparentés au premier degré de patients atteints par ces pathologies [203], ainsi que la survenue d'évènements génétiques acquis indépendants chez un même sujet [220] [402] représentent des arguments en faveur de l'existence de prédispositions génétiques aux NMP, qui ne causeraient pas directement l'apparition de la maladie mais favoriseraient l'acquisition de mutations oncogéniques ou l'émergence d'anomalies préexistantes. Comme nous l'avons détaillé précédemment, une étude récente menée dans le laboratoire a identifié pour la première fois une anomalie génétique prédisposant au développement de TE évoluant rapidement vers des LAM dans plusieurs familles de même origine géographique. Cependant, les données d'analyse de liaison suggèrent une grande hétérogénéité génétique au sein des NMP familiaux et d'autres mécanismes de prédisposition doivent être identifiés.

Une étude préliminaire au laboratoire, par une approche pan-génomique de séquençage d'exomes (WES, whole exome sequencing) (SNP arrays, CGH arrays, exomes, analyse de liaison) dans plusieurs familles de NMP a permis d'identifier au sein de l'une d'elle un variant d'*EPOR*, c.1462C>T (p.Pro488Ser, P488S). La proline en position 488 est située au niveau d'une séquence de liaison à GRB2, conservée chez la souris. Cette mutation apparaît non délétère dans les prédictions bioinformatiques.

Tous les sujets atteints présentent ce mutant d'*EPOR*, ainsi que certains sujets sains. Lors du développement du NMP, *JAK2V617F* est systématiquement présent. Cette mutation d'*EPOR* a déjà été décrite [397] [363]. L'étude la plus poussée, chez un sujet de 42 ans présentant une polyglobulie, retrouvait une hypersensibilité à l'EPO des progéniteurs érythroïdes mais pas de pousse spontanée en absence de la cytokine. De plus, les cellules Ba/F3 exprimant *EPOR* P488S avaient une sensibilité à l'EPO similaire à celles exprimant le récepteur sauvage. *EPOR* P488S avait également été retrouvée chez deux apparentés asymptomatiques du *propositus* [397]. Ces deux articles ont cependant été publiés avant la découverte de *JAK2V617F* et aucune étude sur l'association de ces deux mutations n'a été effectuée.

Nous avons émis l'hypothèse qu'*EPOR* P488S pourrait être un facteur de prédisposition au développement des NMP dans cette famille, en favorisant l'acquisition de *JAK2V617F* ou en sélectionnant des clones *JAK2V617F* déjà présents.

Matériels et méthodes

Lignées cellulaires

Les lignées murines pro-B Ba/F3 et 32D, dépendantes de l'IL-3, ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Serum (DMEM, Invitrogen, Paisley, UK), supplémenté par du sérum de veau fœtal (SVF, Thermo scientific-Hyclone, South Logan, USA) à la concentration finale de 10%, par de la pénicilline (Invitrogen) à la concentration finale de 100U/ml et de la streptomycine (Invitrogen) à la concentration finale de 100µg/ml et du WEHI 5%.

Cytokines

L'EPO recombinante humaine et l'IL-3 ont été données par Amgen (Neuilly sur Seine, France).

Plasmides et constructions

Le mutant EPOR P488S a été généré dans le plasmide pREX-IRES-CD4 par mutagenèse dirigée en utilisant la DNA polymérase haute fidélité PfuUltra (Stratagene Amsterdam, The Netherlands). Le plasmide pREX-IRES-CD4 contenant EPOR sauvage tagué HA (HA-EPOR WT) a été fourni par le Pr S.Constantinescu (Belgique). Le tag HA permet de mettre en évidence EPOR lors des expériences de Western blot et de cytométrie en flux par utilisation d'anticorps (Ac) anti-HA spécifiques, les Ac dirigés contre EPOR n'étant que peu fiables [403]. Les séquences des amorces (Eurogentec) utilisées pour la mutagenèse sont les suivantes:

Sens: 5' CCGATGGCCCCTACTCCAACCTCTTATGAGAACAGCCTTATCCC 3'

Antisens: 3' GGCTACCGGGGATGAGGTTGAGAATACTCTTGTCGGAATAGGC 5'

Les séquences complètes d'EPOR WT et EPOR P488S ont été vérifiées par séquençage.

Les plasmides pMX-JAK2WT-IRES-GFP et pMX-JAK2V617F-IRES-GFP disponibles dans le laboratoire ont permis d'obtenir des cellules Ba/F3 et 32D surexprimant stablement JAK2 sauvage (WT) ou JAK2V617F. pREX-HA-huEPORWT-IRES CD4 ou pREX-HA-huEPOR488-IRES CD4 ont ensuite été transduits dans ces cellules, qui ont par la suite été triées sur la GFP et sur le marquage CD4-APC, comme précédemment décrit [233].

Etude de la viabilité cellulaire

Après 3 lavages dans du PBS 1X afin d'éliminer l'IL-3, 100 μ l d'une solution cellulaire à la concentration de 30 000 cellules/ml ont été plantées en plaques 96 puits, sans cytokine ou à différentes concentrations d'EPO (0.001, 0.003, 0.005, 0.1, 0.3 et 1 U/ml). Chaque condition a été réalisée en triplicata. La prolifération cellulaire a été quantifiée après 48h et 72h de culture par adjonction du réactif WST-1 (5-[2,4-disulfophényl]-2H-tétrazolium, monosodium salt) selon les recommandations du fabricant (Takara Bio Europe, Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France). Les courbes de dose-réponse à l'EPO ont été exprimées en pourcentage de viabilité par rapport à la réponse maximale obtenue et l'IC₅₀ a été calculée grâce au logiciel GraphPad PRISM.

Signalisation induite par EPOR : dose réponse à l'EPO

Après 3 lavages dans du PBS 1X, les cellules ont été cultivées dans du DMEM supplémenté en pénicilline et streptomycine sans sérum ni cytokines pendant 5 heures, puis stimulées avec des doses croissantes d'EPO (0.001, 0.01, 0.1 et 1 U/ml). La signalisation induite par EPOR a été étudiée par Western Blot en utilisant des Ac dirigés contre STAT1 (Tyr 701), STAT3 (Tyr 705), STAT5 (Tyr 684), AKT (Ser 473), ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204), ainsi que les protéines totales (Cell signalling Technology, Ozyme). La β -actine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et le HA ont été utilisés comme contrôles de charge.

Etude de la dégradation d'EPOR : essai à la cycloheximide

Les cellules ont été incubées pendant différents temps avec de la cycloheximide (CHX) (Sigma, Saint Louis, USA) à la concentration de 50ng/ml. Après lyse cellulaire, un Western Blot a été réalisé avec un anticorps anti-HA. La quantification d'HA-EPOR a été réalisée avec le logiciel Image J Software en utilisant la β -actine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) comme contrôle de charge. La demi-vie du récepteur a été calculée grâce au logiciel GraphPad PRISM.

Etude de l'expression de HA-EPOR à la surface cellulaire

L'expression basale de HA-EPOR a été étudiée par cytométrie en flux grâce à un Ac monoclonal anti-HA PE (phycoerythrin) conjugué (MACS Molecular, Miltenyi Biotec) dilué au 1/50.

Etude de l'internalisation d'EPOR

Après lavage des cellules pour éliminer le WEHI et sevrage des cellules pendant 2h, celles-ci ont été stimulées pendant différents temps avec de l'EPO à 1 U/ml puis fixées à la formaline et marquées avec un Ac anti-HA couplé au PE. L'expression du récepteur à la surface cellulaire était ensuite analysée par cytométrie en flux.

Patients et purification des cellules primaires

Tous les sujets ont donné leur consentement éclairé par écrit. Cette étude a été réalisée en accord avec la déclaration d'Helsinki.

Le sang périphérique a été prélevé sur tubes EDTA stériles ou obtenu après saignées des patients concernés.

Après isolation du plasma riche en plaquettes et traitement par ACD à température ambiante, les plaquettes ont été récupérées pour étude de la signalisation de MPL (dose-réponse à la TPO). Les cellules mononucléées issues de la moelle osseuse de patients ont été isolées par Ficoll (Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin, Allemagne). Les cellules progénitrices CD34⁺ et les cellules T CD3⁺ ont été purifiées par billes magnétiques sur AutoMacs (Milteniy Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne).

Cultures clonogéniques des progéniteurs en milieu semi-solide

Les cellules CD34⁺ ont été plantées en duplicata en méthylcellulose en présence de SCF à la concentration de 5 µl/ml, d'IL-3 à la concentration de 2 µl/ml et soit en absence d'EPO soit en présence de concentrations croissantes d'EPO (0.001, 0.01, 0.1 et 1 U/ml). Les colonies érythroïdes BFU-E et granulo-monocytaires CFU-GM ont été comptées à J14 de culture.

D'autre part, les cellules CD34⁺ ont été plantées, en duplicata, en coagulum plasmatiques en absence ou en présence de concentrations croissantes de TPO (0.01, 0.1, 1 et 10 ng/ml). Après 10 jours de culture, la quantification du nombre de colonies mégacaryocytaires CFU-MK a été réalisée comme précédemment décrit [404] [405].

Signalisation de MPL : dose réponse à la TPO

Après purification des plaquettes, une dose réponse a été réalisée avec des doses croissantes de TPO (0.01, 0.1, 1 et 10 ng/ml). La signalisation de MPL a été étudiée par Western Blot en utilisant des anticorps dirigés contre STAT5 (Tyr 684) et pERK1/2 (Thr 202/Tyr 204). HSC-70 a été utilisé comme contrôle de charge.

Génotypage des colonies

Les colonies formées en méthylcellulose ont été repiquées puis traitées par la protéinase K à la concentration de 10 mg/ml (Invitrogen). Le génotypage JAK2 a été réalisé à l'aide du kit de séquençage BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA).

Résultats

1. Description de la famille

EPOR P488S a été identifiée dans une grande famille de NMP, associant des cas de TE, PV et MFP sur deux générations (Figure 10). L'âge au diagnostic apparaît plus précoce à la seconde génération (38 ans pour un cas de PV et 40 ans pour un cas de TE contre 68 ans et 60 ans à la génération précédente), témoignant d'un possible phénomène d'anticipation, déjà rapporté dans les NMP familiaux [218] [221].

EPOR P488S est retrouvée chez tous les patients ainsi que certains sujets sains, suggérant une pénétrance incomplète. L'histoire familiale s'intègre dans une transmission AD à pénétrance incomplète. Les sujets sains porteurs d'EPOR P488S ont un hémogramme strictement normal, ne présentant pas de mutation *JAK2V617F* et n'ont pas d'EEC (colonies érythroïdes endogènes), excepté le sujet IV3 qui présentait de façon inattendue une pousse autonome des colonies érythroïdes. La recherche de *JAK2V617F* dans les BFU-E s'est révélée positive (37% dans un premier clone, 6% dans un second). Ce patient a développé 11 ans plus tard, à l'âge de 55 ans, une PV. *JAK2V617F* a également été détecté chez tous les sujets malades, avec une charge allélique particulièrement faible : 0% au diagnostic pour le sujet III3 (PV puis MF), 6% pour le sujet IV2 (PV), 2% pour le sujet IV10 (TE). De plus, avant que ne se développe la PV, la recherche de *JAK2V617F* dans le sang périphérique était négative pour le patient IV3, mais positive dans les EEC. La recherche de mutations de la séquence complète des gènes *JAK2*, *MPL*, *TET2*, *IDH1/2* et *ASXL1* était négative chez tous les sujets malades. Il n'y avait pas de co-ségrégation de l'haplotype 46/1 dans cette famille. Les caractéristiques cliniques et biologiques des membres de cette famille sont regroupées dans le tableau 4. Les sujets des première et deuxième générations, ainsi que les sujets III1 et III4 n'ont pas été inclus dans ce tableau en raison de l'absence de données les concernant.

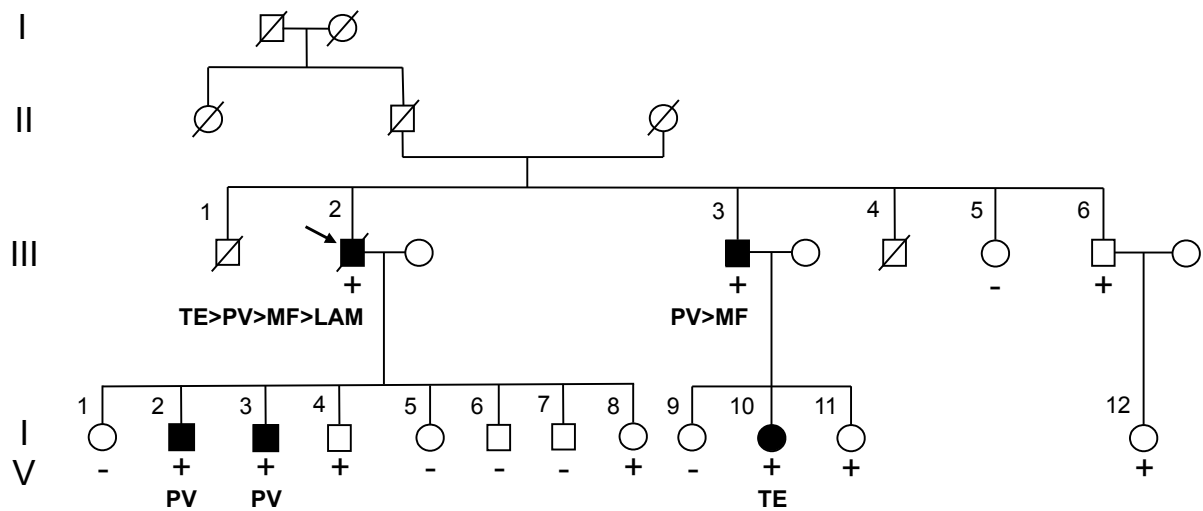


Figure 10 : Arbre généalogique de la famille.

Les symboles pleins représentent les sujets malades. Sous chaque symbole, la première ligne indique le statut pour EPOR P488S (+: mutation présente, -: mutation non détectée). La ligne suivante correspond au NMP au diagnostic, ainsi qu'à l'éventuelle évolution du phénotype. TE: thrombocythémie essentielle, PV: polyglobulie de Vaquez, MF : myélofibrose, LAM : leucémie aiguë myéloïde.

Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et biologiques des membres de la famille

Sujet	Sexe	Diagnostic	Âge au diagnostic	Evolution	EPO sérique	NFS	EPOR P488S	JAK2 V617F	EEC	46/1
III2	M	TE>PV>MF>LAM	68	Décédé	NC	Thrombocytose	+	14%	+	TC
III3	F	PV	60	MF post-PV	Diminuée	Polyglobulie, thrombocytose	+	-	+	TC
III5	F				N	N	-	-	-	CC
III6	M				N	N	+	-	-	CC
IV1	F				N	N	-	-	-	TT
IV2	M	PV	38		N	HLPNN, polyglobulie, thrombocytose	+	6%	+	TT
IV3	M	EEC+ puis PV	NC		NC	Polyglobulie	+	+	+	TC
IV4	M				N	N	+	-	-	TT
IV5	F									TT
IV6	M									TT
IV7	M									TT
IV8	F				N	N	+	-	-	TC
IV9	F				N	N	-	-	-	NC
IV10	F	TE	40		N	Thrombocytose	+	+	+	TC
IV11	F				N	N	+	-	-	TT
IV12	F				N	N	+	-	-	TC

M: masculin, F: féminin, TE: thrombocytémie essentielle, PV: polyglobulie de Vaquez, MF: myélofibrose, LAM: leucémie aiguë myéloïde, NC: non connu, N: normal, EEC: pousse endogène des colonies érythroïdes, +: présence de la mutation, -:absence de la mutation, TT: absence d'haplotype 46/1, CC: haplotype 46/1 homozygote, TC: haplotype 46/1 hétérozygote,

2. Etude d'EPOR P488S dans la lignée cellulaire Ba/F3

La première partie de ce travail avait pour objectif d'étudier le rôle d'EPOR P488S dans la lignée cellulaire Ba/F3, seul ou en association avec JAK2V617F. Pour cela, nous avons transduit des cellules Ba/F3, qui surexprimaient soit JAK2WT soit JAK2V617F, par des rétrovirus pREX-HA-huEPOR-IRES-CD4, contenant EPOR WT ou EPOR P488S. Pour les Ba/F3 et les 32D, quatre lignées ont été obtenues: EPORWT/JAK2WT, EPORWT/JAK2V617F, EPOR488/JAK2WT et EPOR488/JAK2V617F.

Etude de la réponse à l'EPO (test de viabilité au WST-1)

Les tests de viabilité cellulaire au WST-1 n'ont pas mis en évidence d'hypersensibilité ou de pousse spontanée des 32D EPOR P488S par rapport aux 32D EPORWT, que ce soit en présence de JAK2WT ou de JAK2V617F (Figure 11A). Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée Ba/F3.

Etude de la signalisation d'EPOR en réponse à l'EPO

Nous avons étudié la signalisation d'EPOR dans les Ba/F3 en réalisant une dose-réponse à l'EPO, après sevrage des cellules pendant 5 heures. Les voies de signalisation classiquement activées en aval d'EPOR, soit les voies JAK-STAT, PI3K-AKT et ERK1/2, ont été étudiées. Une activation spontanée de STAT5 et d'AKT, faible mais reproductible, dans les Ba/F3 EPOR488/JAK2WT a été observée, contrairement aux Ba/F3 EPORWT/JAK2WT, témoignant d'un effet modéré d'EPOR P488S sur la transduction du signal. Aux concentrations de 0.1 et 1 U/ml d'EPO, EPOR P488S n'engendrait pas d'hypersensibilité à la cytokine, comparé à EPOR WT. Enfin, aucune synergie n'a été observée lorsqu'EPOR P488S était associé à JAK2V617F (Figure 11B).

Etude de l'expression à la membrane d'EPOR WT et EPOR P488S

Nous avons ensuite souhaité étudier la localisation à la surface cellulaire d'EPOR P488S et d'EPOR WT, en présence ou non de JAK2V617F. Il a été décrit dans la littérature que JAK2V617F diminuait la quantité d'EPOR présent à la membrane cellulaire [406]. Après marquage avec un Ac monoclonal anti-HA couplé au PE, nous avons analysé par cytométrie en flux la fluorescence des différentes lignées à l'état basal sous WEHI. Nous avons différencié, parmi les Ba/F3 surexprimant JAK2 (GFP+), celles qui présentaient EPOR à leur membrane (HA-PE+) de celles qui n'exprimaient pas EPOR à leur surface (HA-PE-). Une localisation à la membrane cytoplasmique plus importante pour EPOR P488S que pour

EPOR WT a été observée. La présence de JAK2V617F entraînait une diminution de l'expression d'EPOR WT à la surface cellulaire mais ne modifiait pas la quantité d'EPOR P488S présent à la membrane cellulaire (Figure 11C).

Etude de la stabilité d'EPOR WT et EPOR P488S

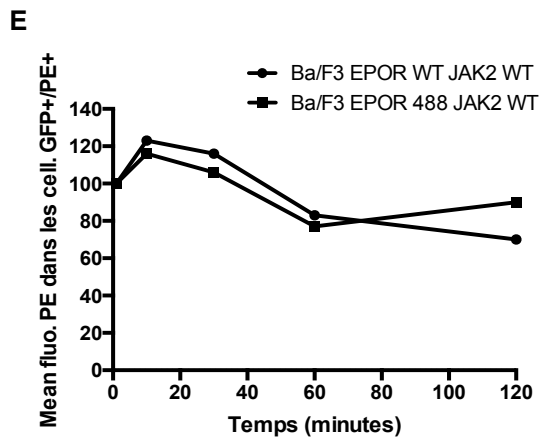
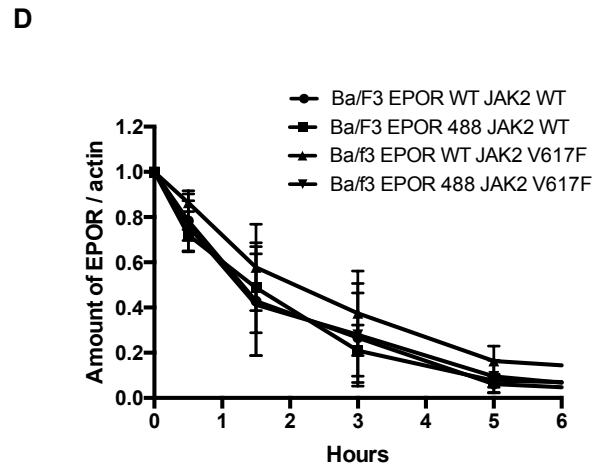
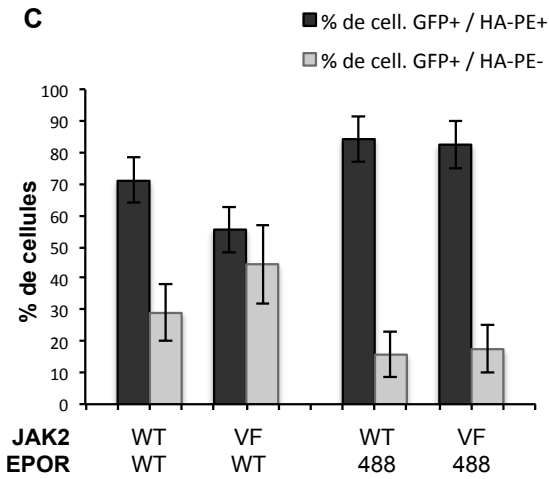
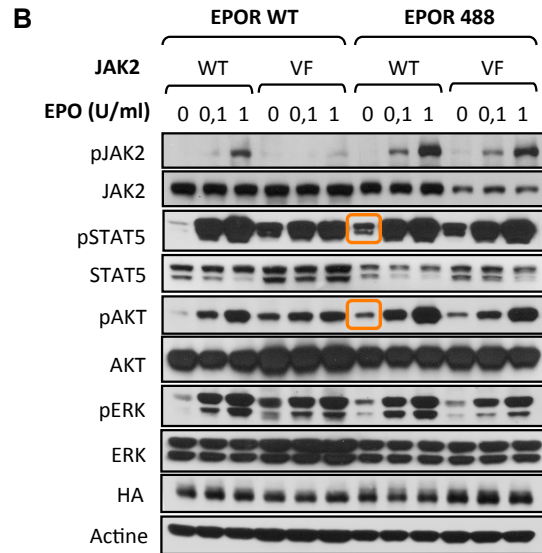
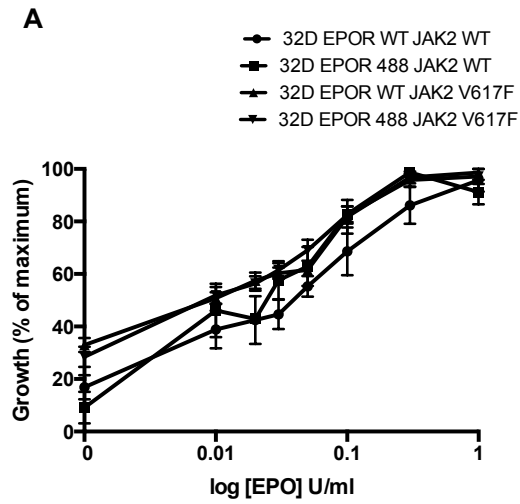
Afin de déterminer si l'expression anormale à la surface cellulaire d'EPOR P488S était due à une augmentation de la stabilité du récepteur, celle-ci a été étudiée en incubant les cellules en présence de CHX. La CHX bloque la synthèse protéique et permet donc d'étudier la demi-vie du récepteur en s'affranchissant des récepteurs nouvellement synthétisés. Aucune différence n'a été observée entre EPOR P488S et EPOR WT, en association ou non avec JAK2V617F (Figure 11D). Des résultats similaires ont été obtenus dans la lignée 32D.

Etude de l'internalisation d'EPOR WT et EPOR P488S

Une autre hypothèse pouvant expliquer la présence accrue d'EPOR P488S à la surface cellulaire était une diminution de l'internalisation du récepteur muté, qui a donc été étudiée par cytométrie en flux. Bien qu'une seule expérience ait été réalisée, aucune différence d'internalisation n'a été observée entre les lignées Ba/F3 EPORWT/JAK2WT et EPOR488/JAK2WT, suggérant que l'expression à la membrane cytoplasmique augmentée d'EPOR P488S n'est pas due à un défaut d'internalisation du récepteur muté (Figure 11E).

Figure 11 : Etude fonctionnelle d'EPOR P488S dans les lignées cellulaires.

(A) Sensibilité à l'EPO. Test de viabilité au WST-1 dans la lignée 32D, après 48h de culture en absence d'EPO ou en présence de concentrations croissantes de la cytokine (0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.3, and 1 U/ml). Les courbes de dose-réponse sont exprimées en pourcentage de la valeur maximale (n=3, en triplicata). (B) Dose réponse à l'EPO. Etude de la signalisation d'EPOR après stimulation des Ba/F3 par des concentrations croissantes d'EPO (0, 0.001, 0.01, 0.1 and 1 U/ml EPO) par Western blot. La β -actine a été utilisée comme témoin de charge. Ces résultats ont été reproduits dans 2 expériences indépendantes. (C) Expression à la surface cellulaire. Etude par cytométrie en flux de l'expression basale d'EPOR à la surface cellulaire des Ba/F3, en association ou non à JAK2V617F, après marquage des cellules cultivées sous Wehi par un Ac monoclonal anti-HA couplé au PE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules GFP+ (JAK2+) / HA-PE+ (EPOR présent à la surface cellulaire) ou HA-PE- (absence d'EPOR à la surface cellulaire). n=2. (D) Stabilité d'EPOR : Réalisation d'un test à la CHX a été réalisé dans les Ba/F3. L'expression du HA a été étudiée par Western blot. Une quantification du HA-EPOR et de la β -actine a été réalisée à l'aide du logiciel Image J. Les courbes représentent les ratios HA/ β -actine. n=3. (E) Internalisation d'EPOR. Après sevrage pendant 2 heures, les cellules ont été stimulées pendant différents temps par de l'EPO à la concentration d'1 U/ml, puis fixées à la formaldéhyde et marquées par un Ac monoclonal anti-HA couplé au PE. L'internalisation a été étudiée par cytométrie. Les résultats représentent la mean fluorescence du PE parmi les cellules GFP+/HA-PE+, normalisée par rapport au t=0. n=1.



3. Cellules primaires

La seconde partie de ce travail reposait sur l'étude des cellules primaires de différents membres de la famille.

Des prélèvements ont été obtenus pour les patients III3 (MF post-PV), IV2 (PV) et IV10 (TE), ainsi que pour les sujets IV4 et IV8, asymptomatiques mais porteurs d'EPOR P488S (EPOR+). Les sujets IV5, IV6 et IV7, sains et non porteurs de la mutation d'EPOR correspondent aux contrôles négatifs (EPOR-). Un prélèvement a également été obtenu pour le sujet IV3 (EEC+) qui présentait initialement une pousse spontanée des colonies érythroïdes avec présence de *JAK2V617F*, avant qu'il ne déclare une PV.

Etude de la réponse à l'EPO et la TPO dans les cellules primaires

Afin d'étudier la réponse des progéniteurs à l'EPO et à la TPO, des cultures en méthylcellulose et en coagulum plasmatiques ont été réalisées. Il n'a été observé ni pousse spontanée ni hypersensibilité à l'EPO ou à la TPO des progéniteurs des patients atteints de PV et TE, ni des sujets sains porteurs d'EPOR P488S. Seul le patient atteint de MF présentait une pousse spontanée des BFU-E et CFU-MK, comme attendu dans cette pathologie. EPOR P488S ne semble donc pas avoir d'impact sur la sensibilité des progéniteurs érythroïdes ou mégacaryocytaires à l'EPO ou la TPO respectivement, en présence de *JAK2V617F* ou non (Figure 12A et B).

Etude de la signalisation dans les plaquettes en réponse à la TPO

La signalisation dans les plaquettes n'était pas non plus modifiée par la présence d'EPOR P488S (Figure 12C).

Génotypage *JAK2V617F* dans les colonies érythroïdes

De manière intéressante, nous avons confirmé que ces patients présentent de faibles charges alléliques de *JAK2V617F* dans les érythroblastes des patients TE et PV (Figure 12D). D'autre part, de façon surprenante, seules des colonies avec un génotypage homozygote pour la mutation *JAK2V617F* ont été retrouvées. Ceci suggère qu'EPOR P488S pourrait favoriser l'expansion des clones homozygotes ou défavoriser celles des clones hétérozygotes.

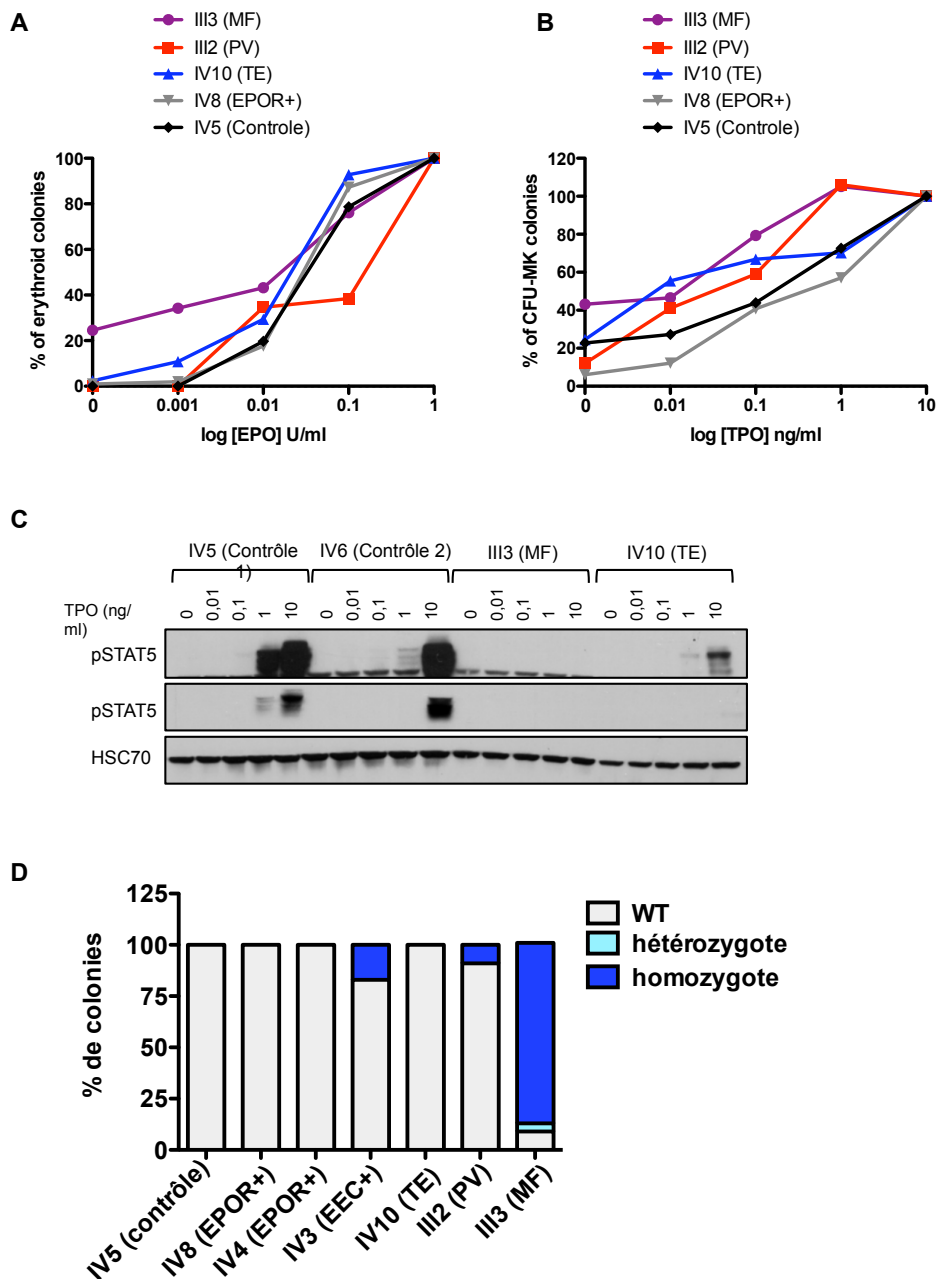


Figure 12 : Etude des cellules primaires.

(A) Sensibilité à l'EPO. Les cellules CD34⁺ de 3 patients, de deux sujets porteurs d'EPOR P488S asymptomatiques et d'un sujet contrôle ont été plantées en duplicata en milieu semi-solide (méthycellulose) en présence de SCF, d'IL3 et en absence d'EPO ou en présence de concentrations croissantes de la cytokine (0.001, 0.01, 0.1, et 1 U/ml). Les BFU-E ont été comptées à J14 de culture. n=1. (B) Sensibilité à la TPO. Les cellules CD34⁺ de 3 patients, de deux sujets porteurs d'EPOR P488S asymptomatiques et d'un sujet contrôle ont été plantées en duplicata en coagulum plasmatique en absence de TPO ou en présence de concentrations croissantes de la cytokine (0.01, 0.1, 1 et 10 U/ml). Les CFU-MK ont été comptées à J10 de culture. n=1. (C) Signalisation dans les plaquettes. Les plaquettes de deux patients et de deux sujets contrôles ont été purifiées puis stimulées par des doses croissantes de TPO (0, 0.01, 0.1, 1 et 10 U/ml). La signalisation a été étudiée par Western blot. HSP70 a été utilisée comme témoin de charge. n=1. (D) Génotypage JAK2 dans les colonies érythroïdes. Les BFU-E obtenues en culture semi-solide ont été repiquées, traitées à la protéinase K puis génotypées pour JAK2WT et JAK2V617F. Les résultats sont exprimés en pourcentage de colonies JAK2 sauvage (WT), JAK2V617F hétérozygotes et JAK2V617F homozygotes.

Discussion et perspectives

L'approche pan-génomique d'une grande famille de NMP a permis d'identifier une mutation constitutive d'*EPOR*, c.1462C>T (P488S), qui était retrouvée chez tous les sujets malades, indiquant un rôle probable dans l'agrégation familiale. Nous avons émis l'hypothèse qu'*EPOR* P488S représentait un facteur de prédisposition au développement de NMP.

La mutation *JAK2V617F* est retrouvée chez tous les sujets atteints de NMP, avec des charges alléliques particulièrement faibles, notamment pour les cas de PV, ce qui a été confirmé par le génotypage des colonies érythroïdes de patients. La présence d'*EPOR* P488S isolé n'induit pas de phénotype particulier chez les sujets de la famille. Nous avons donc développé différentes lignées cellulaires, Ba/F3 et 32D, *EPORWT/JAK2WT*, *EPORWT/JAK2V617F*, *EPOR488/JAK2WT* et *EPOR488/JAK2V617F*, afin d'évaluer l'impact d'*EPOR* P488S, seule et en association avec *JAK2V617F*. Les cellules primaires ont également été étudiées. Une activation spontanée, modérée mais reproductible, de *STAT5* et *AKT* a été observée dans les cellules *EPOR488/JAK2WT*, comparées aux Ba/F3 *EPORWT/JAK2WT*. La présence de *JAK2V617F* ne modifiait pas la signalisation du récepteur. Une localisation à la surface cellulaire plus importante pour *EPOR* P488S que pour *EPOR* WT a également été mise en évidence. Contrairement aux données de la littérature, la quantité du récepteur muté à la membrane cytoplasmique n'était pas modifiée en présence de *JAK2V617F*. Nous n'avons en revanche pas observé de différence entre le récepteur muté et le récepteur sauvage pour la réponse à l'EPO, que ce soit dans les lignées cellulaires ou dans les cellules primaires. *EPOR* P488S avait été précédemment décrit chez un sujet de 42 ans présentant une polyglobulie et chez deux de ses apparentés asymptomatiques. En accord avec nos résultats, le récepteur muté ne modifiait pas la réponse à l'EPO dans la lignée cellulaire Ba/F3, par contre les progéniteurs érythroïdes présentaient une hypersensibilité à la cytokine, ce que nous n'avons pas observé [397]. Ces résultats suggèrent la nécessité d'un facteur additionnel pour le déclenchement de la maladie, qui pourrait être *JAK2V617F*. Nous n'avons pas non plus mis en évidence de modification de la réponse à la TPO des CFU-MK de patients, ni d'anomalie de signalisation dans les plaquettes. La signalisation dans les érythroblastes n'a pu être étudiée en raison d'une faible quantité de cellules CD34⁺ et ces expériences seront réalisées dans le futur. Enfin, la stabilité du récepteur muté et son internalisation étaient semblables à celles du récepteur sauvage.

L'effet d'*EPOR* P488S seul apparaît donc très modéré. Ces résultats rejoignent ceux d'une étude récente qui a mis en évidence qu'une duplication des gènes *ATG2B* et *GSKIP* était responsable de la prédisposition au développement de NMP dans 4 grandes familles, mais n'avait qu'un rôle limité lorsqu'elle était isolée. Elle potentialisait par contre les effets de

JAK2V617F, représentant un environnement génétique favorable à la dominance des clones *JAK2* mutés [237]. Nous n'avons pas observé de coopération entre EPOR P488S et *JAK2V617F*, excepté pour la localisation à la surface cellulaire du récepteur, mais sans cependant entrainer de phénotype dans les lignées cellulaires. Le génotypage dans les érythroblastes de patients a permis de confirmer que la faible charge allélique de *JAK2V617F* dans les PV. D'autre part, nous avons uniquement détecté des clones *JAK2V617F* homozygotes chez ces patients, suggérant qu'EPOR P488S pourrait favoriser la dominance clonale de *JAK2V617F* à l'état homozygote. La présence de *JAK2V617F* chez tous les patients de la famille renforce la théorie d'une coopération entre EPOR P488S et *JAK2V617F*, comme cela a été mis en évidence pour la duplication.

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'EPOR P488S, en coopérant avec *JAK2V617F*, pourrait faciliter et donc accélérer le développement des NMP. Afin de le démontrer, nous devons développer un modèle rétroviral murin permettant d'étudier les éventuelles modifications de l'hématopoïèse et la survenue d'un NMP chez les souris receveuses. Ces expériences pourraient aussi être envisagées à plus long terme grâce à des expériences de greffes en dilution limite, en utilisant la moelle de souris KI *JAK2V617F* [104] transduite par EPOR P488S-IRES GFP. Une étude de Lundberg et al. a en effet montré qu'une cellule *JAK2V617F* ne déclenchait la maladie que dans une souris sur 100 [199]. Nous nous attendons à ce que la maladie se développe plus fréquemment en présence de EPOR P488S qu'en présence d'EPOR WT.

EPOR P488S semble donc avoir un rôle faible sur l'hématopoïèse, difficile à mettre en évidence. Cependant, son mode de transmission AD à pénétrance relativement importante est en accord avec les données de la littérature. En effet, il est admis que la prédisposition aux NMP familiaux est due à des facteurs génétiques variés et rares, mais dont la pénétrance est plus importante que pour les facteurs favorisant l'apparition des NMP au sein de la population générale [211] [217] [219] [220] [218].

En conclusion, si EPOR P488S semble avoir un effet direct limité sur l'hématopoïèse, son mode de transmission et son association systématique à *JAK2V617F* suggèrent que ce mutant joue un rôle dans la prédisposition aux NMP au sein de cette famille. La réalisation de tests fonctionnels plus sensibles pourrait favoriser la mise en évidence de cet effet modéré (test utilisant la luciférase pour l'activation de STAT5, mise en culture d'un faible nombre de cellules en plaque 96 puits en absence de cytokine permettant d'identifier un faible nombre de clones avec une pousse spontanée). La mutation EPOR P488S étant située au niveau d'une séquence conservée de liaison à GRB2, la réalisation d'expériences de co-immunoprécipitation pourrait aussi être intéressante afin d'étudier l'implication éventuelle de cette molécule adaptatrice, d'autant plus qu'une activation spontanée d'AKT a pu être mise en évidence dans les lignées cellulaires. Enfin, le développement de modèles

murins devrait également permettre d'améliorer la compréhension du mécanisme d'action d'EPOR P488S.

Résultats 3 :
Mutations rares de MPL dans les TE triples négatives

Contexte et objectifs du travail

Les NMP classiques non BCR-ABL regroupent la TE, la PV et la MFP. Ces hémopathies malignes présentent des anomalies de la signalisation intracellulaire communes, responsables de la production anormale d'une ou plusieurs lignées myéloïdes, sans blocage de maturation.

La PV est associée quasi-exclusivement à la présence de mutations de *JAK2* (*JAK2V617F* dans 95% des cas et *JAK2* exon 12 dans 4% des cas), alors que les mutations de signalisation observées dans les TE et les MFP sont plus hétérogènes : si *JAK2V617F* demeure l'anomalie la plus fréquente (50% à 60% des TE et MFP), des mutations de *CALR* sont décrites dans 25% des cas et de *MPL* dans 3% à 5% des cas. Les mutations de *MPL* entraînent une activation constitutive du récepteur : *MPLW515* (*W515K*, *W515L*, *W515S*, *W515N*) par perte du résidu tryptophane en position 515 qui maintient normalement *MPL* en conformation inactive et *MPLS505N* qui entraîne la dimérisation constitutive du récepteur. Les mutations de *JAK2*, *CALR* et *MPL* entraînent effectivement toutes une activation spontanée de la voie *JAK2*, bien que le mécanisme d'action des mutations de *CALR* demeure mal connu. Ces mutations sont considérées comme mutuellement exclusives. Quelques cas de patients présentant plusieurs de ces anomalies moléculaires ont été décrits dans la littérature, mais au sein de clones différents. Entre 10% et 15% des patients atteints de TE et MFP ne présentent aucune de ces mutations et sont dits triples négatifs. La recherche de nouvelles anomalies de signalisation se poursuit donc.

Un séquençage d'exomes sur une cohorte de TE triples négatives, débuté dans le laboratoire avant la découverte des mutations de *CALR*, a mis en évidence, chez deux patients, la présence d'une mutation de la partie extracellulaire de *MPL*, p.Ser204Pro, située au niveau de l'exon 4. Elle avait été précédemment identifiée dans un cas de MFP [407]. Une mutation *MPL* affectant le même résidu sérine en position 204, c.611C>T (*MPL* p.Ser204Phe) a également été décrite dans un cas de MFP [408].

La seconde mutation de *MPL*, c.1531T>A (p.Tyr591Asn), située dans l'exon 12 de *MPL* et touchant la partie intracellulaire du récepteur, jamais décrite, a été identifiée chez un patient atteint d'une forme familiale de NMP. Un projet mené récemment au sein du laboratoire a en effet identifié un facteur de prédisposition génétique aux NMP, présent dans 4 familles de TE évoluant rapidement vers des LAM secondaires. Il s'agit d'une anomalie du nombre de copie de deux gènes, *ATG2B* et *GSKIP*, qui, en coopération avec les mutations de signalisation, favorise le développement des NMP. Une recherche exhaustive de mutations dans les gènes habituellement impliqués dans la physiopathologie de la TE a été réalisée dans ces familles, permettant l'identification de *MPL* c.1771T>A (p.Tyr591Asn). Une mutation *MPL*

c.1771T>G (p.Tyr591Asp) a été rapportée dans un cas de PV, associée à une mutation *JAK2V617F* hétérozygote [408].

Les mutations de *MPL* connues touchent en grande majorité le tryptophane 515 et, plus rarement, la région transmembranaire du récepteur (MPLS505N). MPL S204P et Y591N ne sont pas localisées au niveau des régions les plus fréquemment mutées dans les NMP. L'objectif de ce projet était donc leur étude fonctionnelle.

Cet article a été accepté dans la revue *Blood*.

Résultats

Une première partie de ce projet était la recherche de mutations non décrites par séquençage d'exomes dans une cohorte de TE triples négatives. Toutes les mutations détectées par WES (whole exome sequencing) ont été confirmées secondairement par séquençage en Sanger. Deux patients présentaient une mutation MPLS204P, déjà décrite [407], associée à d'autres mutations (3 autres mutations dont une mutation d'*ASXL1* chez le premier patient et 5 chez le second), qui n'étaient pas des mutations driver connues dans les NMP. Les données fonctionnelles étant limitées, nous avons décidé d'étudier le mécanisme de cette mutation. pMX-HA-MPLWT-IRES-GFP ou pMX-HA-MPLS204P-IRES-GFP ont donc été transduits dans la lignée UT7. Les localisations à la surface cellulaire et intracellulaire, la maturation et l'internalisation de ces deux récepteurs étaient semblables. MPLS204P n'induisait pas de pousse spontanée ni d'hypersensibilité à la TPO ou au GM-CSF lors des tests de viabilité au WST-1. L'étude du cycle cellulaire avec de l'iodure de propidium et de l'apoptose avec de l'annexine V ne retrouvait pas non plus de différence entre le récepteur sauvage et MPLS204P. L'étude de la signalisation à faibles doses de TPO a, par contre, mis en évidence une activation des voies de signalisation en aval de MPLS204P plus importante que pour MPLWT. Ce résultat a été confirmé par des expériences utilisant la luciférase, qui ont montré que ce mutant pouvait induire une activation spontanée de STAT5, mais retardée et plus faible que celle observée pour MPLW515K. Ces résultats suggérant une faible activité de ce mutant, un test de prolifération plus sensible que les tests de viabilité au WST-1 a été développé. Les cellules ont été mises en culture en plaques 96 puits en absence de cytokine à la concentration de 20 cellules par puits et le nombre de colonies a été compté après une semaine. Environ 5% à 10% des puits MPLS204P présentaient une pousse autonome, contrairement à MPLWT, suggérant que le récepteur muté induisait une indépendance aux cytokines dans de rares cas (environ 0.25% des UT7). De plus, lorsque de la TPO ou du GM-CSF était ajouté à J3 de culture, l'efficacité de clonage était augmentée de 2 à 4 fois pour les UT7 MPLS204P comparées aux UT7 MPLWT.

La seconde partie de ce travail était l'étude de la mutation *MPL* c. 1771T>A (p.Tyr591Asn), jamais décrite et mise en évidence au sein d'une famille de NMP, dont l'étude a permis de décrire, dans un travail parallèle, une prédisposition génétique aux développements de TE évoluant rapidement vers des LAM par un mécanisme d'anomalie du nombre de copies de deux gènes, *ATG2B* et *GSKIP*. Nous avons transduit dans la lignée cellulaire Ba/F3 avec un plasmide GFP contenant pMX-HA-MPLWT-IRES-GFP soit pMX-HA-MPLY591N-IRES-GFP. L'étude par cytométrie en flux a mis en évidence une expression à la membrane cellulaire de MPLY591N plus importante que celle de MPLWT (1.63 ± 0.07). Les tests de viabilité au WST-1 n'ont pas mis en évidence de pousse spontanée de MPLY591N mais une hypersensibilité à la TPO avec une IC50 de 0.10 ng/mL pour MPLWT et de 0.02 ng/mL pour MPLY591N. Enfin, l'étude de la signalisation du récepteur par réalisation d'une dose réponse à la TPO a mis en évidence une activation spontanée de STAT3 et d'ERK1/2, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de STAT5 pour MPLY591N comparé à MPLWT, pour un niveau d'expression similaire de MPL dans les deux lignées. Aucune différence dans le profil de phosphorylation d'AKT ou de STAT1 n'a été observée. Ces résultats suggèrent donc que MPLY591N induit un gain de fonction modéré, avec une hypersensibilité à la TPO sans pousse spontanée et une activation partielle des voies de signalisation en aval.

Discussion et perspectives

La première partie de ce travail reposait sur l'étude fonctionnelle d'une mutation rare de MPL, S204P. Cette mutation restaure la séquence sauvage du récepteur murin. Il en est de même pour la mutation MPL Baltimore (MPL p.Lys39Asn), observée dans des cas de thrombocytoses familiales [409]. MPL p.Lys39Asn est moins exprimée à la membrane cellulaire que le récepteur sauvage, pouvant expliquer l'apparition d'une thrombocytose par une diminution de la dégradation de la TPO dans les mégacaryocytes et les plaquettes, ce qui n'a pas été observé pour MPLS204P. Plusieurs mutations de la partie extracellulaire de MPL ont été décrites. MPLY252H a été identifiée dans un cas de TE. Les CFU-MK du patient ainsi que des cellules Ba/F3 exprimant stablement ce mutant présentaient une hypersensibilité à la TPO, comparé au récepteur sauvage [410]. Il n'existe pas de données fonctionnelles sur MPLS204F ou S204P dans la littérature indiquant un éventuel effet sur la réponse à la TPO. Une étude fonctionnelle de MPLS204P a donc été réalisée. Nous avons mis en évidence que cette mutation entraînait un faible gain de fonction, puisque seuls des tests de viabilité/prolifération et de signalisation (luciférase) plus sensibles que les expériences habituellement réalisées ont permis de mettre en évidence un effet de ce mutant dans la lignée UT7. De plus, MPLS204P était associée à une mutation d'*ASXL1* chez un des patients et à une mutation d'*HELZ* (helicase with zinc finger), une RNA hélicase

impliquée dans la prolifération cellulaire, chez le second, suggérant que MPLS204P ne suffit pas à induire seul de phénotype de TE et doit être accompagné d'autres anomalies moléculaires.

La seconde partie de ce travail reposait sur l'étude fonctionnelle d'une autre mutation rare de *MPL*, c.1771T>A (p.Tyr591Asn ou Y591N), située dans la partie intra-cytoplasmique proximale. Tout comme les tyrosines 625 et 630, Y591 est phosphorylée lors de la liaison de la TPO à MPL [411]. Cependant, contrairement à Y625 et Y630 qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire en réponse à la TPO, Y591 est un site de régulation négative du signal [412], comme en témoigne l'expression du mutant MPLY591F dans la lignée Ba/F3, qui entraîne une diminution de la phosphorylation du récepteur, une hypersensibilité des cellules à la TPO ainsi qu'une augmentation et une prolongation de l'activation des voies de signalisation, notamment ERK1/2 [413] [411]. MPLY591 est également un site de liaison à AP2, impliquée dans l'endocytose du récepteur [413]. Il a également été mis en évidence que le résidu Y591 était phosphorylé de façon constitutive dans le cadre de la mutation MPLW515A et que le phénotype des doubles mutants MPL Y591F/W515A était plus sévère que celui de MPLW515A seul, confirmant le rôle d'Y591 dans la régulation négative du signal de MPL [414]. Ces résultats suggéraient que, de même que le mutant MPLY591F, MPLY591N pourrait être une mutation gain de fonction. Nous avons effectivement observé, dans les Ba/F3 exprimant stablement cette mutation, une hypersensibilité à la TPO associée à une activation spontanée de STAT3 et ERK1/2, comparé à MPLWT. De plus, confirmant le rôle de Y591 dans l'internalisation du récepteur, MPLY591N était plus exprimé à la surface cellulaire que MPLWT. Cependant, tout comme ce que nous avons observé pour MPLS204P, ces effets étaient modestes. MPLY591N apparaît donc comme une mutation gain de fonction faible. Une autre mutation de cette tyrosine, MPLY591D, avait précédemment été identifiée dans un cas de PV, associée à une mutation hétérozygote *JAK2V617F* [408], renforçant l'idée que la perte de cette tyrosine intra-cytoplasmique ne peut, seule, induire de phénotype de NMP. Contrairement à MPLS204P, la recherche de mutations associées par séquençage d'exomes n'a pas été réalisée. Cependant, MPLY591N a été mise en évidence dans le contexte particulier de cas familiaux de NMP dont le locus de prédisposition, une duplication de 700pb en 14q32.2 responsable d'une pousse spontanée des CFU-MK chez les patients, a été identifié. Ce travail réalisé dans le laboratoire a mis en évidence une coopération entre la duplication et *JAK2V617F*. Il est donc possible que cette prédisposition génétique agisse de même avec MPLY591N et que leur association induise un phénotype de TE, compensant le faible effet de cette mutation de MPL.

Cette étude a permis d'améliorer la compréhension du fonctionnement de deux mutations rares de *MPL*, S204P et Y591N, qui représentent des mutations gain de fonction faible et doivent être associées à d'autres anomalies génétiques pour induire un phénotype de TE. Il pourrait être d'autre part intéressant de réaliser un séquençage complet de *MPL* dans les

cas de TE où aucune des mutations driver les plus fréquentes n'est observée (*JAK2*, *CALR*, *MPL* W515K/L/A/N et S505N).

Article 3 :

**Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL)
mutations in triple negative Essential Thrombocythemia
Patients**

Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple negative Essential Thrombocythemia Patients

Xénia Cabagnols*^{1,2,3}, Fabrizia Favale*^{1,2,3}, Florence Pasquier*^{1,2,3}, Kahia Messaoudi^{1,2,3},
Jean Philippe Defour^{4,5}, Jean Christophe Ianotto⁶, Christophe Marzac⁷, Jean Pierre Le
Couédic^{1,2,3}, Nathalie Droin^{1,2,3}, Ilyas Chachoua^{4,5}, Remi Favier^{1,2,3}, M'boyba Khadija
Diop^{1,2,3}, Valérie Ugo⁸, Nicole Casadevall^{1,2,3,7}, Najet Debili^{1,2,3}, Hana Raslova^{1,2,3}, Christine
Bellanne-Chantelot^{1,2,3,9}, Stefan N. Constantinescu^{4,5}, Olivier Bluteau^{1,2,3}, Isabelle Plo§^{1,2,3},
and William Vainchenker§^{1,2,3,10}

¹ INSERM, UMR 1170, Gustave Roussy, Villejuif, France

² Université Paris-Sud, UMR1170, Gustave Roussy, Villejuif, France

³ Gustave Roussy, Villejuif France

⁴ de Duve Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium

⁵ Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium

⁶ CHU Brest, service d'hématologie, Brest, France

⁷ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Saint Antoine, Paris, France

⁸ CHU Brest, Laboratoire d'Hématologie, Brest, France

⁹ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Département de Génétique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

¹⁰ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Consultation d'hématologie-Immunologie, Hôpital Saint Louis, Paris, France

* These authors contributed equally

§ These authors contributed equally

Running title : MPL and ET

Corresponding author : William Vainchenker UMR U1170, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, verpre@igr.fr

Key Word: Whole exome sequencing, NGS, essential thrombocythemia, thrombopoietin receptor, mutations

Abstract: 191 words

Manuscript: 3983 words

Keypoints:

-Enrichment of atypical MPL mutations in Essential Thrombocythemia

-*MPLS204P* and *MPLY591N* mutants are weak gain-of-function mutants

Abstract (191)

Mutations in signaling molecules of the cytokine receptor axis play a central role in myeloproliferative neoplasm (MPN) pathogenesis. Polycythemia Vera is mainly related to *JAK2* mutations, whereas a wider mutational spectrum is detected in Essential Thrombocythemia (ET) with mutations in *JAK2*, the *thrombopoietin receptor (MPL)* and the *calreticulin (CALR)* genes. Here, we studied the mutational profile of 17 ET patients negative for *JAK2V617F*, *MPLW515K/L* and *CALR* mutations, using Whole Exome Sequencing and Next Generation Sequencing (NGS) targeted on *JAK2* and *MPL*. We found several signaling mutations including *JAK2V617F* at very low allele frequency, one homozygous *SH2B3* mutation, one *MPLS505N*, one *MPLW515R* and two *MPLS204P* mutations. In the remaining patients, four presented a clonal and seven a polyclonal hematopoiesis, suggesting that certain triple negative ETs are not MPNs. NGS on 26 additional triple negative ETs detected only one *MPLY591N* mutation. Functional studies on *MPLS204P* and *MPLY591N* revealed that they are weak gain-of-function mutants increasing MPL signaling and conferring either TPO hypersensitivity or independence to expressing cells, but with a low efficiency. Further studies should be performed to precisely determine the frequency of *MPLS204* and *MPLY591* mutants in a bigger cohort of MPN.

Introduction

According to the WHO classification, Essential Thrombocythemia (ET), Polycythemia Vera (PV) and Primary Myelofibrosis (PMF) belong to the classical non-BCR-ABL1 Myeloproliferative Neoplasms (MPNs).^{1,2} All the non-BCR-ABL1 MPNs are associated with persistent and hyper-activation of the JAK2/STAT signaling pathway, but ET and PMF are heterogeneous disorders. *JAK2V617F* is the predominant mutation found in 50%-60% of the ET cases.³ Other signaling molecules are mutated in ET including MPL and SH2B3 (LNK). The most prevalent *MPL* mutations in ET and PMF occur on tryptophan 515, an amino acid that maintains MPL in an inactive form in the absence of cytokine. The most frequent mutations are the substitution of W515 to L and K found in 3-5% of ETs and PMFs. Of note, it is the loss of tryptophan, but not the acquisition of a particular residue that induces constitutive activation of MPL,⁴ leading to the MPN phenotype. Less frequently, the S505N mutation located in the exon 10 coding for the transmembrane domain induces a dimerization of the transmembrane helix in an active conformation.⁵ This last mutation has been initially found in some hereditary thrombocytosis,⁶ but has also been detected in rare sporadic ETs and PMFs.^{7,8} In addition, other MPL mutants have already been described, more particularly in the extracellular domain of MPL in very rare ETs and PMFs, but without providing evidence for a gain-of-function.⁸⁻¹² *SH2B3* loss-of-function mutations, are present in less than 1% of ET and PMF, but may not be sufficient to induce a MPN.^{13,14}

Recurrent mutations in the exon 9 of *CALR* have been recently found in around 25% of ETs and PMFs. They all induce a frameshift leading to a new C-terminus peptide composed of at least 35 amino acids with loss of the endoplasmic reticulum (ER) retention signal, KDEL.^{15,16} Whereas wild type *CALR* is essentially involved in the quality control of proteins and in calcium storage in the ER,¹⁷ the *CALR* mutants are able to activate the JAK2/STAT pathway *via* an unknown mechanism like the other MPN driver mutations.¹⁵ The same

signaling mutations are found in ETs and PMFs underscoring they have a close pathogenesis requiring MK hyperplasia although they are clinically different diseases.^{15,16}

Presently the ETs and PMFs, which are negative for *JAK2V617F*, *CALR* and *MPL* mutations are called “triple negative” MPNs.¹ However, the entire sequence of *MPL* is not usually examined in patients. Depending of the particular clinical centers, there is a wide variety of *MPL* mutations that are screened (*MPLW515K/L* or all substitutions of W515 or mutations on exon 10 including *MPLS505N*). Usually only *MPLW515K/L* are searched by allele specific PCR. Whereas the triple negative PMF have a poor prognosis,^{18,19} triple negative ETs have a good prognosis. However, it is presently unknown whether these triple negative MPNs are a homogeneous entity.

In this study we have investigated using Whole Exome Sequencing (WES) the mutational profile of 17 triple negative ET patients previously identified as negative for *JAK2*, *MPL* and *CALR* mutations. This group was heterogeneous with 7 cases that did not display any clonal mutations. In the other cases there was enrichment in *SH2B3* and atypical *MPL* mutations located in the exons 10 and 4 (*MPLS204P*). NGS targeted on *MPL* and *JAK2* exons in 5 of these patients and 26 additional patients lead to the discovery of a second *MPLS204P* mutation not seen in WES and another atypical *MPL* mutation (*MPLY591N*). Sensitive functional studies revealed that both were low gain-of-function mutants. Our results demonstrate that some clonal non-canonical *MPL* gain-of-function mutations are associated with triple negative ETs.

Material and Methods

Patient cohort

Blood samples were obtained from Saint Louis Hospital and Saint Antoine Hospital (Paris) and Brest CHU and approved by the local Ethics Committees. Written informed consent was in accordance with the Declaration of Helsinki. For most of the patients, the diagnosis was performed according to the WHO recommendation including a bone marrow biopsy.^{20,21} *MPLW515K/L* and *JAK2V617F* genotyping were performed by allele-specific q-PCR.^{22,23} The mutational status of *CALR* was determined using previously described high-resolution sizing of fluorescent dye-labeled PCR amplification of exon 9 and Sanger sequencing for validation.²⁴ Plasma TPO levels were measured by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay according to the manufacturer's instructions (R&D system, Lille, France).

CGH arrays

CGH arrays from granulocytes were conducted on human CGH 2x400K (G4448A) by hybridization of sample *versus* normal-matched commercial reference and a hierarchical clustering was performed²⁵.

Whole Exome Sequencing

WES was performed on genomic DNA (1 µg) from paired samples (granulocytes *versus* T cells) The final libraries were indexed, pooled and sequenced on Illumina HiSeq-2000 sequencer. Only non-synonymous and splice-site mutations were further pursued. A special analysis using BWA ALN for mapping and GATK HaplotypeCaller allowed us to detect insertions and deletions. Candidate mutations observed in the exon sequencing were validated using Sanger sequencing^{15,16,26}.

MPL and JAK2 gene sequencing:

Ion AmpliSeq™ Custom Panel Primer Pools for *MPL* and *JAK2* were used (10 ng of gDNA per primer pool) to perform multiplex PCR but the protocol to generate libraries was modified by adding paired-end adaptors (NEXTflex, Bioo Scientific) to sequence in an Illumina MiSeq flow cell using the onboard cluster method, as paired-end sequencing (2x250 bp reads) (Illumina, San Diego, CA). The entire *MPL* and *JAK2* exons were sequenced to reach a 1000x depth. Minimum variant frequency was set at 1%. Sanger sequencing of the CD3⁺ DNA assessed the somatic status of the mutation.

Cell lines and cell culture

Cytokine-dependent (GM-CSF) human UT7 cell line was cultured in alpha medium 10% SVF, and 5 ng/mL GM-CSF. This UT7 cell line did not express *MPL* and did not response to TPO. IL-3 dependent murine pro-B Ba/F3 cells were cultured in Dulbecco medium with 10% SVF and 5% WEHI.

DNA manipulations, production of retroviruses

The 1531T>A (Y591N), 610T>C (S204P) point mutations were introduced into the MEGIX-human *MPL*-IRES-GFP plasmid by the site-directed mutagenesis method using the PfuUltra high-fidelity DNA polymerase (Stratagene, Agilent Technology, les Ulis, France). Vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) pseudotyped viral particles were produced into 293EBNA cells as previously described²⁷.

Flow Cytometry

Cells were labeled with a monoclonal anti-HA antibody conjugated to PE or an isotype control. APC-Annexin V staining was performed according to the manufacturer recommendations (Becton Dickinson (BD), Le Pont de Claix, France). For cell cycle analysis, cells were treated with lysis buffer (sodium acetate with Triton X-100), RNase and labeled with propidium iodide for 30 min. Cells were analyzed on a LSR2 flow cytometer (BD). Data were analyzed with Flow Jo software.

Confocal microscopy

Cells (100,000) were plated on polylysine slides, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized with 0.2% Triton. Primary monoclonal antibodies against GM130 and CALR (Abcam, Cambridge, UK) and HA (Covance, (Eurogenec, Seraing, Belgium) were incubated in BSA 0.2% solution for 1 h followed by secondary goat anti-mouse (Alexa 546) or anti-rabbit (Alexa 633) antibodies (Life technologies, Saint-Aubin, France). DAPI was used to label nuclei. Cells were analyzed using a confocal Leica microscope.

Western Blotting

Signaling studies were performed on UT7 and Ba/F3 cell lines by Western blot analysis of JAK2 (Tyr 1007/1008), STAT1 (Tyr 701), STAT3 (Tyr 705), STAT5 (Tyr 694), ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) and AKT (Thr 308) and of these different pan proteins (Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France)). HSC70 (Stressgen, Victoria, Canada) or β -Actin (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) serves as loading control.

STAT5 reporter assay

Gamma 2A JAK2-deficient cells²⁸ were transfected with cDNA coding for MPL or MPL mutants, STAT5, JAK2, Spi-Luc (STAT5 transcriptional reporter) and pRL-TK.^{29,30} After 5 h

the cells were stimulated with 10 ng/mL human TPO. Cells were lysed from 24 h to 48 h later and the luciferase activity was measured, as described.⁴

Cell proliferation

30,000 cells/mL were seeded in a 96 well plate with TPO or GM-CSF at various concentrations. Cell proliferation was quantified 3 days later using WST-1 assay (Takara (Ozyme))³¹. Experiments were done in triplicate. Dose-response curves to TPO were expressed as percent of viability of the maximal response.

Colony formation assay

Twenty cells per well were sorted in a 96 well plate. For each condition, we filled 1 plate with GM-CSF at 5 ng/mL and 8 plates without cytokine. After 3 days, 5 ng/mL GM-CSF or 10 ng/mL TPO were added to perform rescue experiments in half of the plates grown without cytokine. Colony formation was counted at day 8. Each experiment was repeated three times, but the TPO addition was performed in only one experiment.

Results

WES and overview of genetic alterations

We studied 17 patients diagnosed as triple negative ETs namely negative for any *JAK2V617F*, *MPLW515K/L* and *CALR* exon 9 mutations. We performed WES on paired granulocyte and T cell samples that were considered as the tumoral and control cells, respectively. The sequencing coverage mean was 110x and 75% of the target sequences could be analyzed with a coverage above 15x. All candidate mutations with a $p < 0.05$ generated by the bioinformatics analysis were verified by Sanger sequencing.

Sanger sequencing confirmed 22 missense, 4 nonsense and 2 splice mutations, and 3 frame-shifting indels leading to a total of 31 mutations out of 80 candidates. The mutation rate per sample was low (1.82), even in comparison to other myeloid malignancies (Supplemental Table S1). Furthermore, CGH arrays performed on 5 samples were normal.

In a first analysis, three patients displayed previously described *MPL* mutations including two in exon 10 (*MPLW515R* and *MPLS505N*) and one in exon 4 (*MPLS204P*) (Figure 1B). A homozygous nonsense mutation in the *SH2B3* gene was identified in one patient. The unexpected identification of known *MPL* mutations led us to perform deep re-sequencing of all *MPL* and *JAK2* exons resulting in the detection of *JAK2V617F* in one patient and again a *MPLS204P* mutation in another patient (Figure 1C, Supplemental Table S2). These mutations were not seen in WES because of low allelic burden for the *JAK2* mutation (<5%) and low depth of coverage at this position for the *MPLS204P*.

No signaling mutations were identified in the remaining eleven ET patients (Figure 1A). We divided them in clonal and non-clonal disorders, as performed in several previous studies.³²⁻³⁵ Four of them showed a clonal hematopoiesis in granulocytes based on the presence of non-recurrent mutations of unknown function. Seven patients had no detectable clonal mutations

suggesting the presence of a polyclonal hematopoiesis in granulocytes. Neither *CALR* exon 9 mutations nor *JAK2V617F* could be detected in their platelets (data not shown).

Noteworthy, the two *MPLS204P*-positive samples were associated with other mutations: one displayed three other mutations including another driver mutation *ASXLI* and the second presented five mutations different from known MPN driver mutations, but with a mutation of the RNA helicase *HELZ*, which may play a role in oncogenesis (Table 1). The patient identified with an acquired *MPLS505N* mutation (absent in T cells) also exhibited a mutation in *SRSF2* with a higher variant allele frequency suggesting that *MPLS505N* was a secondary event (Table 1). Of interest, this case presented some myelodysplastic features detected by pathology associated with a slight increase in blast count in a bone marrow aspirate. This patient was re-classified as a MDS with a thrombocytosis rather than as a true ET patient. Finally, there was a case exhibiting both homozygous non-sense *SH2B3* and *SF3B1* mutations (Table 1) without any noticeable increase in ring sideroblasts or sign of MDS at bone marrow aspiration, thus eliminating a RARS-T.

Taken together these data indicated that atypical *MPL* mutations seem to be recurrent in the so-called triple negative ET. NGS targeted on *MPL* and on *JAK2* was performed on 31 patients including 5 ETs studied in WES and 26 additional less well-characterized ETs. Another mutation of *MPL* with a variant allele frequency of 9.28% was detected. This missense *MPL* mutation (c.1351T>A) leads to the substitution of a tyrosine by asparagine in the cytosolic domain (Y591N). We also detected a missense mutation in *JAK2* (N1108S) with a variant allele frequency of 50% in both the granulocytes and the T cells. Sequencing of hair DNA confirmed it was a germline mutation (Figure S1). The c.3323A>G has been reported as a rare polymorphism (0.36%). However, the 3D modeling of JAK2N1108S predicts that it may provide a slight gain-of-function based on a higher propensity of formation of a tighter

hydrogen bond between S1108 and N1085, which is linked to the active state of JAK2 kinase domain (Figure S2).

Functional analysis of the MPLS204P mutant

In one of the two *MPLS204P*-positive patients we examined TPO level that was in the normal range (12 pg/mL, normal <30 pg/mL) and comparable to other ETs (range: 8.25-96.1 pg/mL). To study cell surface localization of MPL, we transduced the human factor-dependent UT7 cell line with the HA-tagged MPLWT- and MPLS204P-expressing retrovirus (IRES-GFP). At similar GFP levels, the mean fluorescence intensity of HA labeling was comparable for both receptors using flow cytometry (Figure 2A). Expression of MPLS204P at the cell surface was further confirmed by Western Blotting. A 85 kDa Endoglycosidase-H (Endo-H)-resistant band corresponding to the mature form of MPL was detected for MPLWT and MPLS204P (Figure 2B). The subcellular localization of the two receptors was examined by confocal microscopy. They had a similar localization in the ER (anti-CALR antibody) and Golgi (anti-GM130 antibody) compartments (Figures 2C and D). Finally, we studied the internalization of the receptors after TPO addition using the Ba/F3 cell line. No difference was observed between the MPLWT and MPLS204P (Figure 2E). Taken together, these results suggest that the thrombocytosis was not related to a defect in cell-surface localization of MPLS204P, which would have induced a loss of TPO clearance activity.

We studied the effects of MPLS204P on cell proliferation. MPLS204P did not induce cytokine-independent growth nor it renders cells hypersensitive to TPO or GM-CSF hypersensitivity (Figures 3A and B). In addition, we could not find any difference in apoptosis in the presence (Figure 3C) or absence (Figure 3D) of TPO or in cell cycle at different TPO doses (Figure 3E). No constitutive activation in STAT3, STAT5 and AKT was observed in UT7 cells expressing MPLS204P (Figure 4A). These results suggest that

MPLS204P is a weak gain-of-function mutant. We further used a more sensitive technique to ask whether the MPLS204P was able to support TPO-independent JAK/STAT signaling like MPLW515K.⁴ We employed a luciferase reporter assay for STAT5 activation induced *via* MPL in the JAK2-deficient gamma2A cells.⁴ Expression of MPLS204P supported TPO-independent JAK2/STAT5 signaling, albeit to lower levels than MPLW515K (Figure 4B). Of interest, while MPLW515K-induced JAK2/STAT5 activation was evident at 24-30 h after transfection, a longer period was necessary for MPLS204P (> 40 h). This indicates that the MPLS204P mutant signals are weaker than those induced by MPLW515K.

Finally, we tested whether MPLS204P could induce prolonged signaling in UT7 cells. Cells were stimulated with 10 ng/mL TPO, subsequently washed and then cultured without cytokine for 3 h. A sustained phosphorylation of STAT5 and AKT was observed for the mutant cells (Figure 4C). To demonstrate that this weak constitutive activity exerts some biological consequence a limiting dilution of MPLWT and MPLS204P UT7 cells (twenty cells per well in a 96-well plate) were grown without cytokine for one week (Figure 5A). Autonomous growth numbered as colonies was observed with UT7 MPLS204P (5%-10%), but not with UT7 MPLWT, except in rare wells suggesting that around 0.25% of UT7 cells became cytokine-independent due to MPLS204P. Furthermore, after 3 days of culture without cytokines we added GM-CSF or TPO for rescue, and observed a 2 to 4-fold increased cloning efficiency for UT7 MPLS204P compared to MPLWT (Figures 5B and C).

Altogether these results demonstrate that MPLS204P is a gain-of-function mutant.

Functional analysis of the MPLY591N mutant

We conducted the functional analysis of another MPL mutant identified by NGS using Ba/F3 cells lines. Flow cytometry analysis showed that MPLY591N was addressed more efficiently (1.63 ± 0.07 fold) to the cell surface membrane compared to MPLWT at similar GFP levels (Figure 6A), indicating either an increased trafficking of MPL mutant to cell

surface or a decreased internalization. We measured the impact of this mutant on cellular proliferation in response to TPO. MPLY591N conferred a 4- to 5-fold hypersensitivity to TPO compared with MPLWT (IC₅₀ of 0.10 ng/mL for WT and 0.02 ng/mL for Y591N), but without spontaneous growth in the absence of cytokine (Figure 6B).

We next verified the effect of MPLY591N mutant on signaling in Ba/F3 cells by Western Blot analysis. Noticeably, these cells expressed similar levels of exogenous MPL. Interestingly, a constitutive phosphorylation of STAT3, STAT5 and ERK was observed in MPLY591N mutant cells compared with MPLWT cells. The TPO dose-dependent increase in the phosphorylation of these molecules was higher in presence of MPLY591N than MPLWT. No difference was observed on AKT or STAT1 phosphorylation (Figure 6C).

Altogether, these results show that MPLY591N is also a weak gain-of-function mutation that leads to TPO hypersensitivity without independent growth and to a partial spontaneous activation of signaling pathways.

Discussion

The goal of this work was to characterize the mutational genomic profile of triple negative ETs using WES. Among the 17 triple negative ETs, we considered that 7 had a polyclonal hematopoiesis in granulocytes as no mutation was detected by WES. This molecular approach has clear limitation because it cannot detect mutations in non coding sequences and gene fusion and even more cannot detect mutations in coding sequences at low variant allele frequency (VAF). In this work, we defined clonal hematopoiesis as the presence of any somatic mutation either in a known driver of hematopoietic malignancies or in another gene (passenger mutation),³²⁻³⁵ but without using X chromosome inactivation assays except in two cases where results were concordant. It has been calculated that each normal HSC accumulates 0.13 mutation per year in coding sequences³⁶. Thus, it expected that in the case of clonal hematopoiesis in patients older than 50, several mutations would be found. However, the technique has a sensitivity of around 10% for VAF. Thus, it seems likely that this “polyclonal” triple negative thrombocytosis cases can be MPNs with a low VAF in granulocytes similar to *JAK2V617F* ET in which VAF is much higher in platelet RNA than in granulocyte DNA³⁷. Therefore, it will be important in the future to directly perform WES or whole genome sequencing on megakaryocyte or to sequence platelet RNA. Alternatively, some of these disorders can be other diseases than MPNs, more particularly hereditary thrombocytosis. In the co-submitted paper, germline gain-of-function mutations in *JAK2* and *MPL* were found in triple negative ETs.³⁸ Hereditary thrombocytosis may arise without other familial cases if the patient is the founder. In one case, we detected a germline mutation in *JAK2* (N1108S) that appears in *in silico* modeling as a possible gain-of-function mutation, suggesting a hereditary thrombocytosis. However this mutation has also been described as a rare polymorphism. Thus we cannot exclude that rare *JAK2* or *MPL* variants, which may be present in the general population, can induce a MPN disease in certain individuals.

The enrichment in previously described rare signaling mutations,⁹ was striking in triple negative ETs. One was a homozygous nonsense mutation in *SH2B3*. Heterozygous *SH2B3* mutations were reported in MPNs and it is discussed whether by themselves they could give rise to a MPN.¹⁴ In some cases they are associated with *JAK2V617F*.³⁹ Here, the mutation is homozygous and because mice totally deficient in *Sh2b3* develop a myeloproliferative disorder,⁴⁰ we can suggest that this homozygous mutation leading to an absence of LNK was really the driver of the MPN. Interestingly, a *SF3B1* mutation was associated with this homozygous *SH2B3* mutation, but the phenotype of the disease was an ET.

Four mutations in *MPL* were found in the first series of patients, including *MPLS505N* and *MPLW515R* located in exon 10 that are not commonly screened. The later were somatic mutations in our study although they can also be identified as germline mutations in hereditary thrombocytosis.^{6,41}

In two other patients we detected an acquired *MPLS204P* mutation. This mutation has been previously described in a myelofibrosis, and a S204F mutation was described in another myelofibrosis case.^{10,12} In the co-submitted manuscript paper, S204P and S204F mutations were detected in two triple negative patients.³⁸ It is interesting to note that mouse *MPL* residue 204 is a proline instead of a serine in human *MPL*, thus the S204P mutation restores the mouse *MPL* sequence into the human *MPL*. Moreover, the germline mutation K39N (*MPL* Baltimore) present in a heterozygous form in 7% of African-American population also restores a mouse sequence and is associated with a thrombocytosis.⁴² It is tempting to assume that differences between the human and mouse *MPL* sequences may contribute to the high platelet count in mice associated with an elevated plasma TPO level in comparison to the situation in humans. In the case of the K39N, there is evidence that the membrane expression level of the *MPL* mutant is lower than *MPL*WT and this can explain a thrombocytosis phenotype due to a decreased TPO clearance activity of *MPL*, which is in great part related to

the expression level of MPL on the surface of mature megakaryocyte and platelets.⁴² This has been well demonstrated in 3 murine models.⁴³⁻⁴⁵ Here, we clearly demonstrate that the thrombocytosis induced by MPLS204P is not due to a defect in cell trafficking of the receptor. In contrast, MPLS204P is a weak gain-of-function mutant in signaling, inducing a constitutive STAT activation using sensitive approaches and an increased and more prolonged ligand-induced STAT phosphorylation than MPLWT. Using limiting dilution techniques, it was possible to demonstrate that MPLS204P could induce cytokine-independent growth with a low efficiency in around 1/400 UT7 cells. Furthermore, UT7 MPLS204P cells were more resistant than UT7 MPLWT cells to a 3-day cytokine deprivation. The two cases with MPLS204P were associated with several other mutations: one with *ASXLI*, the second with a mutation in an RNA helicase implicated in proliferation. Thus, we suspect that these mutants with a very low oncogenic potential, would need to be associated to other drivers to give rise to a MPN.

Finally, we detected a MPLY591N mutant in one patient. MPLY591D has been previously described in a PV patient in association with a heterozygous *JAK2V617F* mutation¹⁰ as reported in the co-submitted manuscript. Here, we detected the MPLY591N in the absence of a *JAK2* mutation. This mutation was assumed to be a gain-of-function for two reasons. Previously it was shown that this tyrosine also called 78 (intracellular tyrosine) is phosphorylated on the MPLW515A and that the double mutant MPLW515A/Y591F induced a much more severe MPN in the mouse than the single MPLW515A mutant.⁴⁶ Furthermore, this tyrosine is also phosphorylated after TPO binding, and negatively regulates MPL signaling by promoting its internalization degradation as well as ERK signaling.^{46,47 48} Asparagine is a polar residue in contrast to the negative charge represented by tyrosine phosphorylation and thus the Y591N mutation resembles a Y591 loss-of-function, like Y591F, but possibly weaker since unlike phenylalanine, asparagine is polar. When the Y591N mutant

was expressed in Ba/F3 cells it induced a slight TPO hypersensitivity, which was associated to a constitutive activation of STAT3 and ERK. In the *MPLY591N*-positive patient, we did not perform WES to assess whether other driver mutations were present, as for *MPLS204P*. However, this mutant was detected in a case of ET occurring in a familial form of MPN where we have recently identified the predisposition locus consisting of a 700-kb duplication involving 6 genes. The overexpression of two of them, *ATG2B* and *GSKIP*, induces TPO hypersensitivity and cooperates with *JAK2*, *MPL* and *CALR* mutations to give an ET.²⁵ Thus, the predisposition locus could be the initiating event and the low gain-of-function *MPLY591N* could be sufficient to induce an overt ET.

Altogether this study has shown that in a fraction of the so-called triple negative ETs a significant proportion of patients have mutations in signaling molecules, more particularly in *MPL*. This group of patients appears heterogeneous including some with a polyclonal hematopoiesis as previously shown in pediatric ETs.⁴⁹ Further studies using whole exome sequencing and RNA sequencing will be required to better understand the pathogenesis of these ETs.

Acknowledgments

We want to thank E. Leroy for modeling JAK2N1108S and the bioinformatic platform of Gustave Roussy for analyzing the NGS experiments. We are grateful to P. Rameau for cell sorting experiments. Support to SNC is acknowledged from Ludwig Institute, Salus Sanguinis, Fondation contre le cancer, Fonds National de la Recherche Scientifique, Inter-University Attraction Pole and Action de recherche concertée projects, Belgium. This work was funded by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (Thrombocytosis, WV), the Ligue Nationale contre le Cancer (équipe labellisée), the Fondation Laurette Fugain (WV, IP),

Agence Nationale pour la Recherche-Jeune Chercheur (IP), a specific grant from Gustave Roussy (taxe d'apprentissage) and from the INSERM. IC was supported by a FRIA fellowship. XC was supported by the university Paris-Diderot, FF by the INSERM (poste d'accueil) and FP by the Fondation pour la recherche contre le Cancer.

Author contribution

WV, IP, designed and performed research, analyzed data, prepared figures, and wrote the paper; performed research and analyzed data; XC performed and interpreted pangenomic analysis, prepared figures and wrote the paper; FF and FP performed functional analysis, prepared figures and wrote the paper; KM performed functional analysis and prepared figures; JPD and IC performed luciferase assays; JCI, VU and NC were involved in clinical part; RF performed the TPO Elisa assays; CM performed the CALR sizing and provided genotyped samples; JPLC and ND performed the WES; MKD did bioinformatics study of exome data; OB collected samples, performed the targeted NGS approach and prepared figures; ND, HR and SC gave an experimental/intellectual input and corrected the manuscript; CBC provided samples, interpreted the NGS, gave an experimental/intellectual input and all authors contributed to editing.

Contribution Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no potential conflict of interest.

References

1. Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2014;28(7):1407-1413.
2. Wadleigh M, Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *Int J Hematol*. 2010;91(2):174-179.
3. Vainchenker W, Dusa A, Constantinescu SN. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19(4):385-393.
4. Defour JP, Itaya M, Gryshkova V, et al. Tryptophan at the transmembrane-cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(7):2540-2545.
5. Ding J, Komatsu H, Iida S, et al. The Asn505 mutation of the c-MPL gene, which causes familial essential thrombocythemia, induces autonomous homodimerization of the c-Mpl protein due to strong amino acid polarity. *Blood*. 2009;114(15):3325-3328.
6. Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004;103(11):4198-4200.
7. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008;112(1):141-149.
8. Chaligne R, Tonetti C, Besancenot R, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia*. 2008;22(8):1557-1566.
9. He X, Chen Z, Jiang Y, Qiu X, Zhao X. Different mutations of the human c-mpl gene indicate distinct haematopoietic diseases. *J Hematol Oncol*. 2013;6:11.
10. Kawamata N, Ogawa S, Yamamoto G, et al. Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. *Exp Hematol*. 2008;36(11):1471-1479.
11. Lambert MP, Jiang J, Batra V, Wu C, Tong W. A novel mutation in MPL (Y252H) results in increased thrombopoietin sensitivity in essential thrombocythemia. *Am J Hematol*. 2012;87(5):532-534.
12. Williams DM, Kim AH, Rogers O, Spivak JL, Moliterno AR. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol*. 2007;35(11):1641-1646.
13. Koren-Michowitz M, Gery S, Tabayashi T, et al. SH2B3 (LNK) mutations from myeloproliferative neoplasms patients have mild loss of function against wild type JAK2 and JAK2 V617F. *Br J Haematol*. 2013;161(6):811-820.
14. Oh ST, Simonds EF, Jones C, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;116(6):988-992.
15. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379-2390.
16. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391-2405.
17. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(6):842-846.
18. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(16):2507-2513; quiz 2615.
19. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014;28(7):1472-1477.

20. Cervantes F, Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnosis, prognostic factors, and staging. *Seminars in oncology*. 2005;32(4):395-402.
21. Barosi G, Ambrosetti A, Finelli C, et al. The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *British journal of haematology*. 1999;104(4):730-737.
22. 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.
23. Chaligne R, James C, Tonetti C, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood*. 2007;110(10):3735-3743.
24. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2015;29(1):249-252.
25. Saliba J, Saint-Martin C, Di Stefano A, et al. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nature genetics*. 2015.
26. Damm F, Mylonas E, Cosson A, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer discovery*. 2014;4(9):1088-1101.
27. Plo I, Nakatake M, Malivert L, et al. JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;112(4):1402-1412.
28. Kohlhuber F, Rogers NC, Watling D, et al. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(2):695-706.
29. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(49):47954-47963.
30. Sliva D, Wood TJ, Schindler C, Lobie PE, Norstedt G. Growth hormone specifically regulates serine protease inhibitor gene transcription via gamma-activated sequence-like DNA elements. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(42):26208-26214.
31. Marty C, Saint-Martin C, Pecquet C, et al. Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood*. 2014;123(9):1372-1383.
32. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nature medicine*. 2014;20(12):1472-1478.
33. McKerrell T, Park N, Moreno T, et al. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell reports*. 2015;10(8):1239-1245.
34. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England journal of medicine*. 2014;371(26):2477-2487.
35. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England journal of medicine*. 2014;371(26):2488-2498.
36. Klco JM, Spencer DH, Miller CA, et al. Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer cell*. 2014;25(3):379-392.
37. Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Spivak JL. Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2 V617F and Mpl expression. *Blood*. 2006;108(12):3913-3915.
38. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, et al. Whole exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;Co-submitted.
39. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia*. 2010;24(10):1713-1718.
40. Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(12):1599-1611.
41. Vilaine M, Gourain V, Cleyrat C, et al. Germline MPLW515R mutation in a family with isolated thrombocytosis 2012;54nd Annual Meeting of the American-Society-of-Hematology (ASH), Atlanta(Myeloproliferative Syndromes - Basic Science: Poster I).

42. Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(31):11444-11447.
43. Lannutti BJ, Epp A, Roy J, Chen J, Josephson NC. Incomplete restoration of Mpl expression in the *mpl*^{-/-} mouse produces partial correction of the stem cell-repopulating defect and paradoxical thrombocytosis. *Blood*. 2009;113(8):1778-1785.
44. Meyer SC, Keller MD, Woods BA, et al. Genetic studies reveal an unexpected negative regulatory role for Jak2 in thrombopoiesis. *Blood*. 2014;124(14):2280-2284.
45. Ng AP, Kauppi M, Metcalf D, et al. Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(16):5884-5889.
46. Pecquet C, Staerk J, Chaligne R, et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. *Blood*. 2010;115(5):1037-1048.
47. Drachman JG, Kaushansky K. Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(6):2350-2355.
48. Sangkhae V, Saur SJ, Kaushansky A, Kaushansky K, Hitchcock IS. Phosphorylated c-Mpl tyrosine 591 regulates thrombopoietin-induced signaling. *Experimental hematology*. 2014;42(6):477-486 e474.
49. Karow A, Nienhold R, Lundberg P, et al. Mutational profile of childhood myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2015.

Figure legends

Figure 1: Genomic analysis

A) *A schematic representation of the signaling mutations in the 17 patients and of the type of hematopoiesis in triple negative ETs.* We consider as polyclonal ETs the patients that exhibit no mutation (driver or passenger) in WES. **B)** *Sanger sequencing of MPLS204P.* Nucleotides and amino acid numbers are indicated.

Figure 2: MPLS204P does not exhibit cellular trafficking defects

A) *MPL cell-surface expression analysis by flow cytometry.* UT7 cells transduced with either the HA-tagged MPLWT or HA-tagged MPLS204P receptor were incubated with an anti-HA antibody coupled with PE. Histograms show equivalent GFP expression (left) monitoring the total MPL levels and HA-PE labeling (right) corresponding to similar cell-surface expression

of MPLWT and MPLS204P. **B) Analysis of the different forms of MPL.** UT7 MPLWT and MPLS204P cell extracts were treated with EndoH (500 U, overnight at 37°C) and Western blot analysis was performed using anti-HA antibody. Figure shows the different forms of MPL with EndoH-resistant mature form corresponding to a 85 kDa band which is equivalent in both cell lines. Samples were run on the same gel and vertical lines have been inserted to indicate a repositioned gel lane. **C) Localization of MPL in the endoplasmic reticulum (ER) and D) in the Golgi apparatus.** MPLWT and MPLS204P UT7 cells were analyzed by immunofluorescence using an anti-CALR (ER marker), an anti-GM130 (Golgi apparatus marker) and an anti-HA (MPL detection) antibodies. **E) Internalization of the MPLWT and MPLS204P after TPO binding.** These experiments were performed with Ba/F3 cells expressing either MPLWT or MPLS204P. MPL cell surface expression was studied by flow cytometry after TPO addition. Results are means \pm SD of 3 independent experiments.

Figure 3: MPLS204P does not present proliferative advantage in bulky cultures

A and B) Cell proliferation induced by TPO of MPLWT and MPLS204P UT7 cells. Cells were cultured in the presence of various concentrations of TPO (A) or GM-CSF (B) for 72 h. Viable cells were quantified by WST-1 proliferation assay. Dose-response curves are means \pm SEM (n=3 in triplicate). **C and D) Apoptosis analysis in MPLWT and MPLS204P UT7 cells.** **(C)** Cells were cultured for 2 days with various concentration of TPO (0.01, 0.05 and 10 ng/mL) and the percentage of apoptotic cells (Annexin V positive) was analyzed by flow cytometry using Annexin V assay. **(D)** Cells were cultured for 24 h with TPO (10 ng/mL) followed by overnight deprivation. The percentage of apoptotic cells (Annexin V-positive) was analyzed at different times after TPO removal (1, 2, 3 and 4 days). **E) Cell cycle analysis of MPLWT and MPLS204P UT7 cells.** Cells were cultured for 2 days with various

concentration of TPO (0.01, 0.05 and 10 ng/mL) and the percentage of cells in G1, S and G2 phases were determined after propidium iodide labeling, by flow cytometry analysis.

Figure 4: MPLS204P is a weak gain-of-function mutant

A) Signaling studies induced by high TPO concentration in MPLWT and MPLS204P UT7 cells. After cytokine deprivation, cells were stimulated with TPO (100 ng/mL for 5 min, 30 min or 2 h). The phosphorylation status of STAT3, STAT5, AKT and ERK1/2 was examined by Western blotting and results were compared to cells stimulated by GM-CSF (5 ng/mL). **B) STAT5 transcriptional activity in Gamma 2A JAK2-deficient cells expressing MPLWT or MPLS204P.** Cells were transfected with cDNAs coding for MPLWT or MPLS204P, JAK2, STAT5 and with Firefly STAT5 luciferase reporter spi-Luc and pRL-TK vectors coding for renilla luciferase. Luminescence was measured after 48 h transfection. Shown are average units \pm SEM of one representative experiment performed in triplicate out of three. **C) Persistent signaling in UT7 MPLS204P.** UT7 MPLWT and UT7 MPLS204P were stimulated by TPO (10 ng/mL) for 10 min and subsequently washed. A 3 h time-course was performed followed with Western blotting, as in previous figures. MPLWT and MPLS204P samples were run on the same gel. P-STAT5/STAT5 or P-ERK/ERK ratios are indicated after quantification by image J software.

Figure 5: UT7 MPL S204P cells are less cytokine-dependent than UT7 MPL WT.

A) Growth of UT7 MPLS204P and UT7 MPLWT at limiting dilution without cytokines. Cells (20 per well) were cultured without cytokines in a 96-well plate. Colony growth were counted one week later. **B) Rescue experiments by GM-CSF.** Cells (20 per well) were cultured without cytokines in a 96-well plate. After 3 days, GM-CSF (5 ng/mL) was added and colonies were counted one week later. **C) Rescue experiments by TPO.** Cells (20 per

well) were cultured without cytokines in a 96-well plate. After 3 days, TPO (10 ng/mL) was added and colonies were counted one week later. Results represent the means \pm SD of the number of colonies /96-well plate. Each point corresponds to number of clone in one plate.

Figure 6: Analysis of the MPLY591N mutant.

A) *MPL cell-surface localization in Ba/F3 cells.* Ba/F3 cells expressing the bicistronic retroviral pMEGIX-IRES-GFP vector encoding HA-tagged MPLWT or MPLY591N and GFP were maintained in IL3-supplemented medium. Flow cytometry analysis was assessed and histograms show equivalent GFP expression (left) monitoring the total MPL levels and HA-PE labeling (right) corresponding to cell-surface expression of MPLWT and MPLY591N. **B) *Sensitivity to TPO of Ba/F3 cells.*** Ba/F3-MPLWT or MPLY591N cells were cultured for 72 h either in absence of cytokine (black arrow, X axis) or in presence of increasing doses of TPO (0.01, 0.1, 1 and 10 ng/mL). Viable cells were quantified by WST-1 proliferation assay. Dose-response curves are means expressed in percentages of maximum growth value \pm SEM (n=3 in triplicate). Two-tailed *t*-test, * <0.05 **, $p<0.01$. **C) *Signaling studies in Ba/F3-MPL cells.*** Ba/F3-MPLWT or MPLY591N cells were serum- and cytokine-starved for 6 h prior to a 15 min stimulation without or with TPO (0.01, 0.1, 1 and 10 ng/mL) as indicated. Cells were lysed and the phosphorylation status of STAT1, STAT3, STAT5, AKT and ERK1/2 was examined by Western blotting with the respective anti-phospho specific antibodies, as indicated. MPL expression was also verified. Expression of β actin in the samples was used as loading control and was consistent with expression of total AKT, ERK1/2 and the individual STAT isoforms. Blots shown were reproduced in three independent experiments.

Table 1: Mutational profile in granulocytes from 10 ET patients by exome sequencing.

The % of variant allele frequency is indicated in brackets.

Sample	Mutations					
3	SCNN1G (21.34)					
12	SHOC2 (22.22)	CASC5 (25.0)				
14	MPL S204P (19.26)	ASXL1 (20.97)	EDA (41.18)			
21	KPNA1 (28.21)	VPS13D (39.29)	EEA1 (39.79)	SF3B1 (54.55)	SH2B3 (98.33)	
24	FUBP1 (23.88)	PPP1R3 7 (30.77)	COMP (36.14)	ADCY5 (36.67)	HELZ (37.25)	MPL S204P (47.74)
25	ATXN7L1 (21.95)					
32	LYZL2 (30.77)					
91	MPL S505N (23.02)	DDI1 (24.18)	IMPG2 (24.24)	PPP2R5 A (43.75)	SRSF2 (44.35)	APOL4 (86.52)
92	JAK2 V617F (11.77)	ALDH3A 2 (28.12)				
98	MPL W515R (23.94)					

Figure 1.

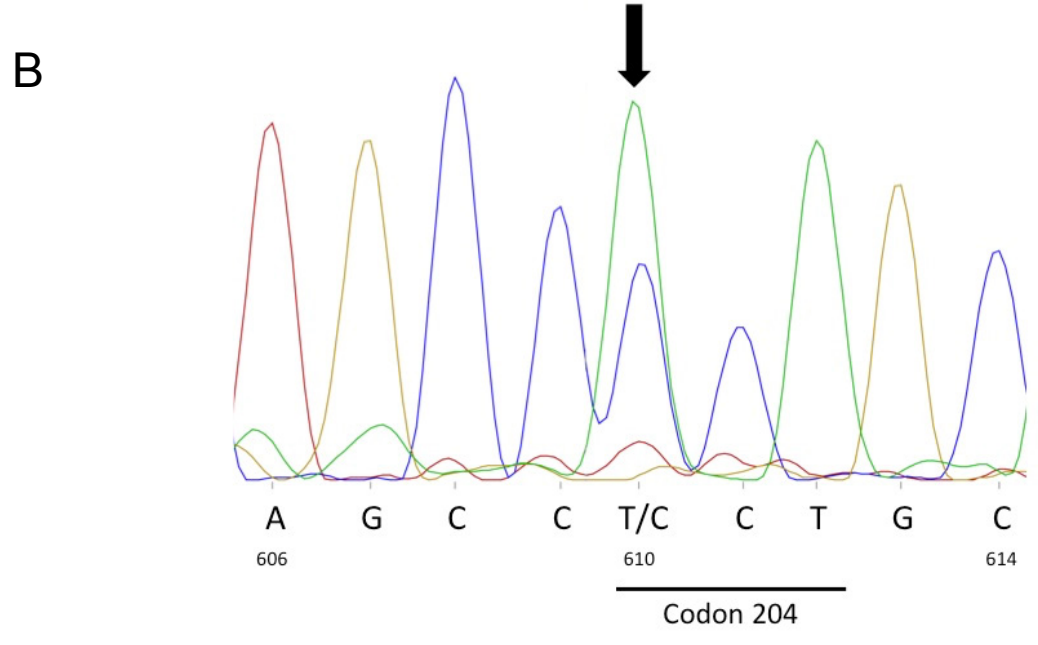
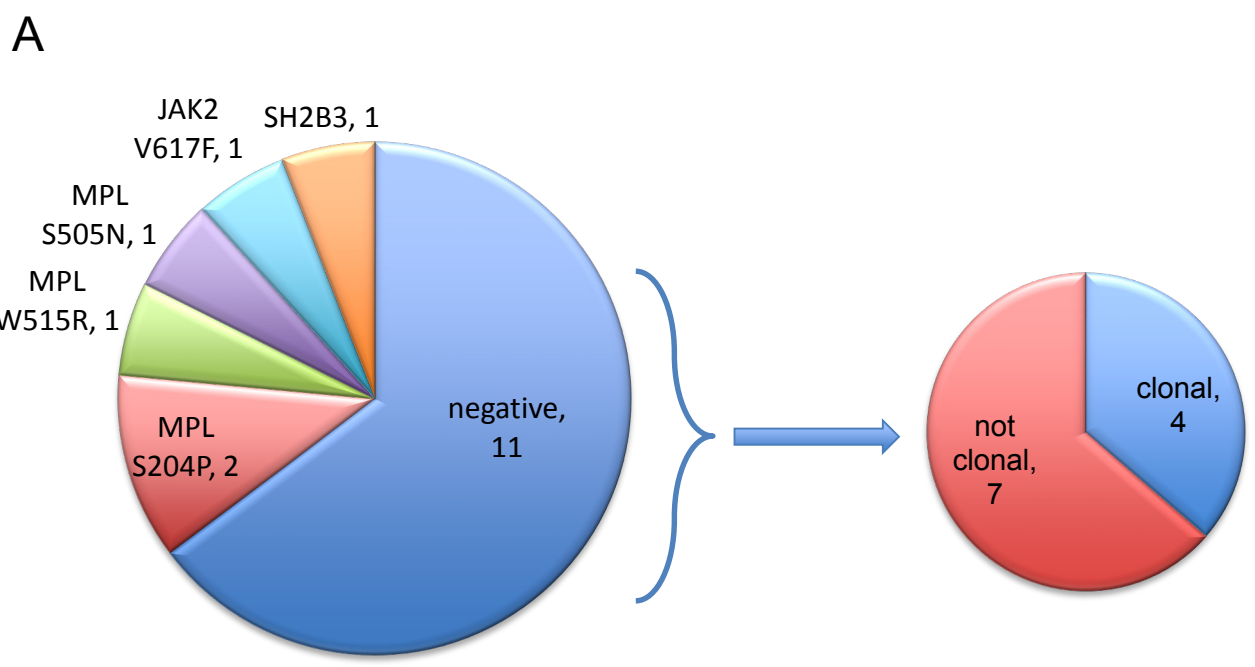


Figure 2.

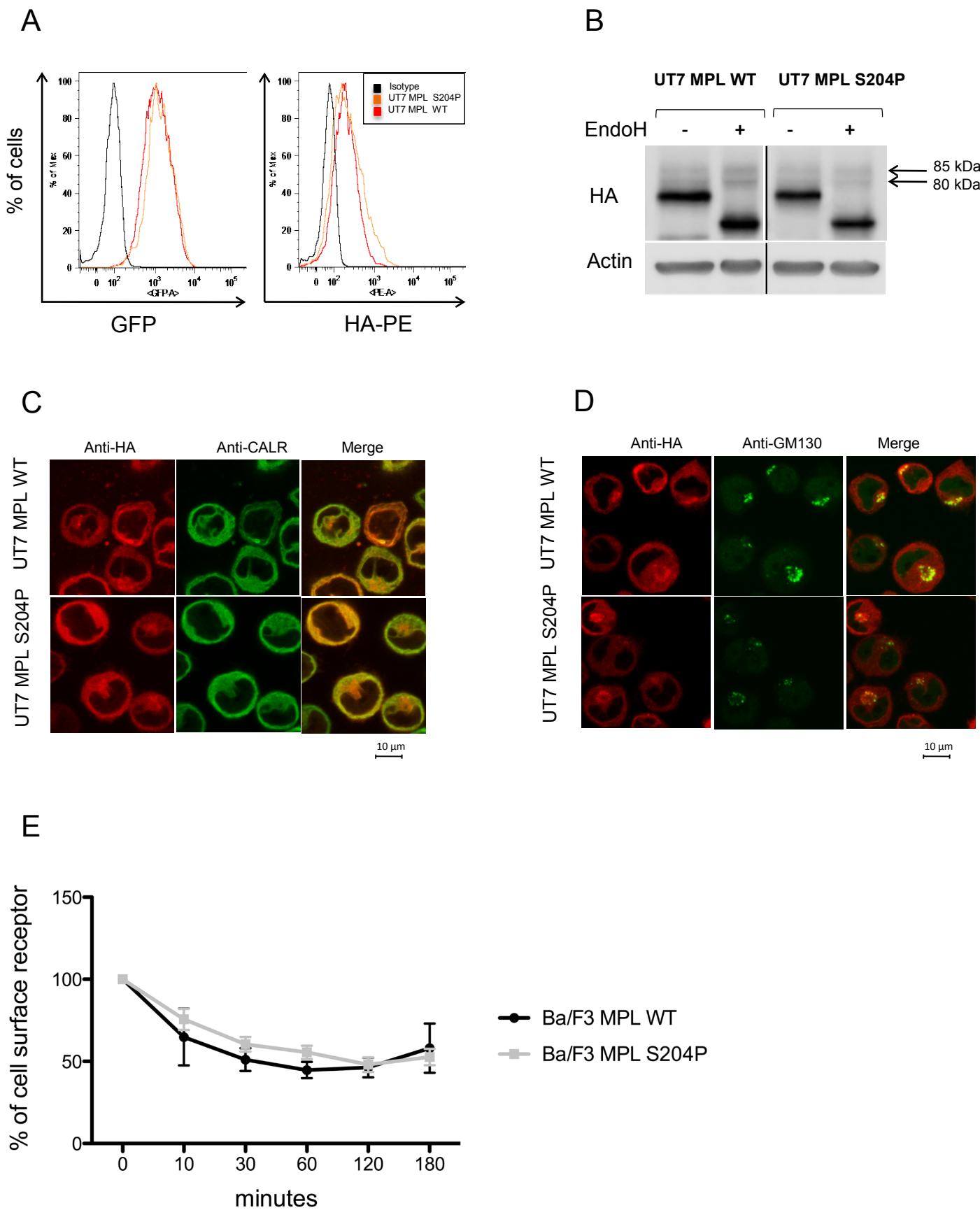


Figure 3.

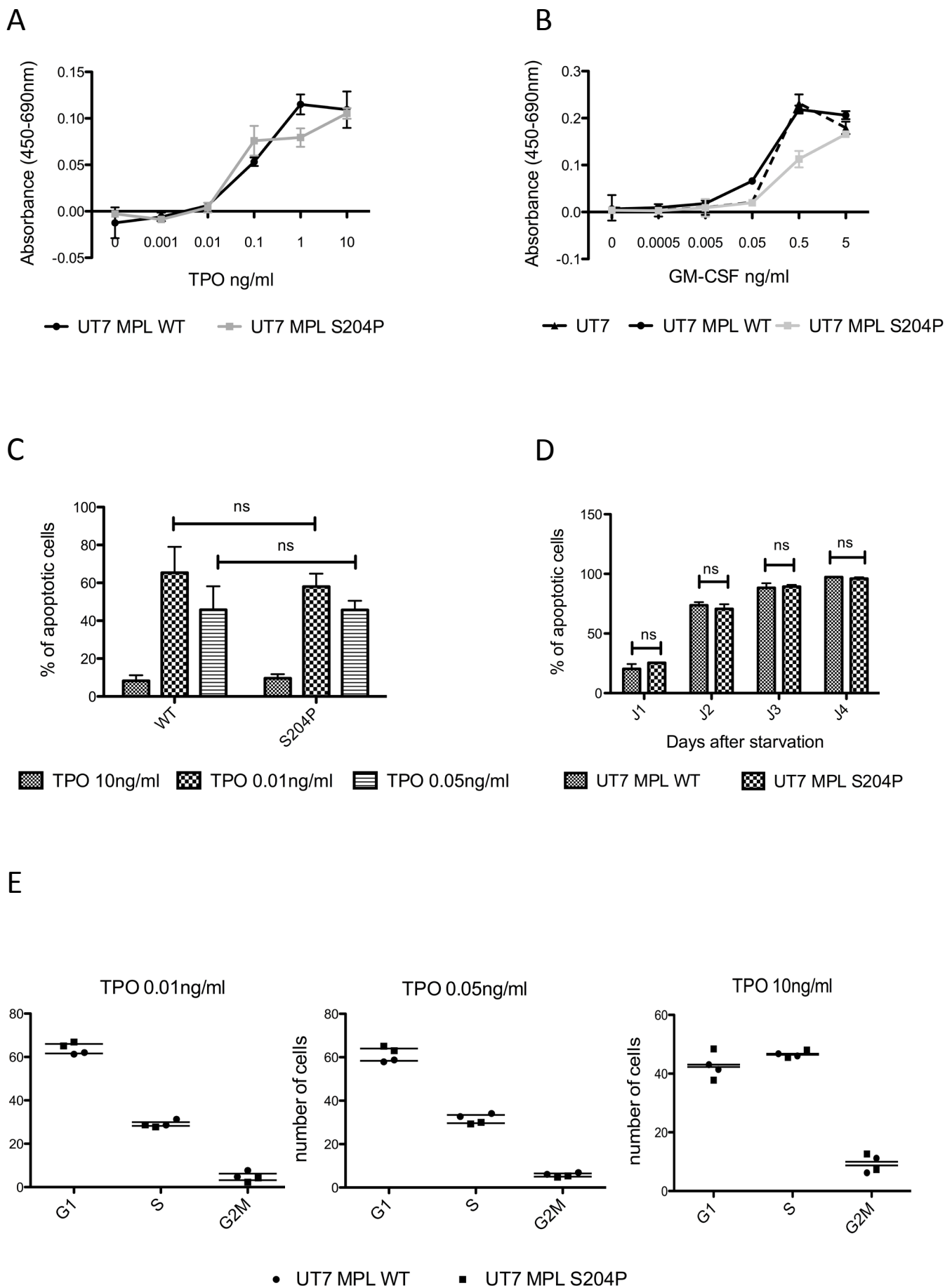
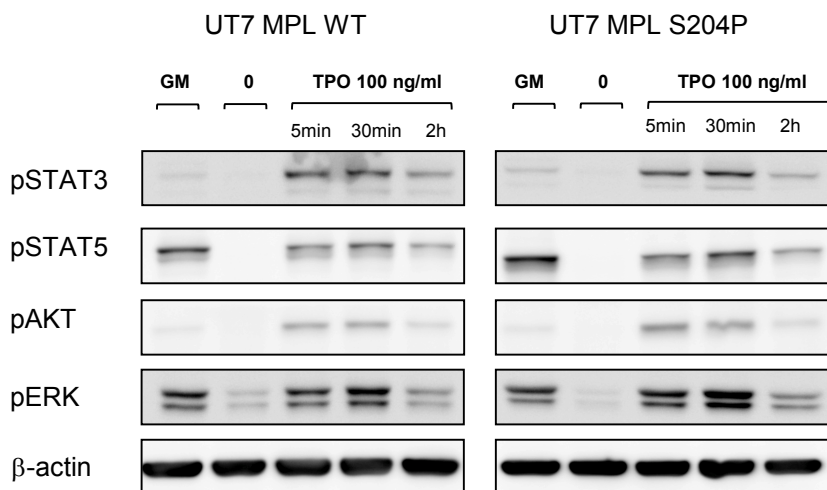
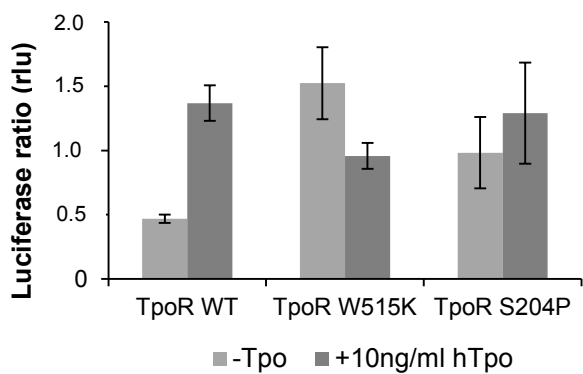


Figure 4.

A



B



C

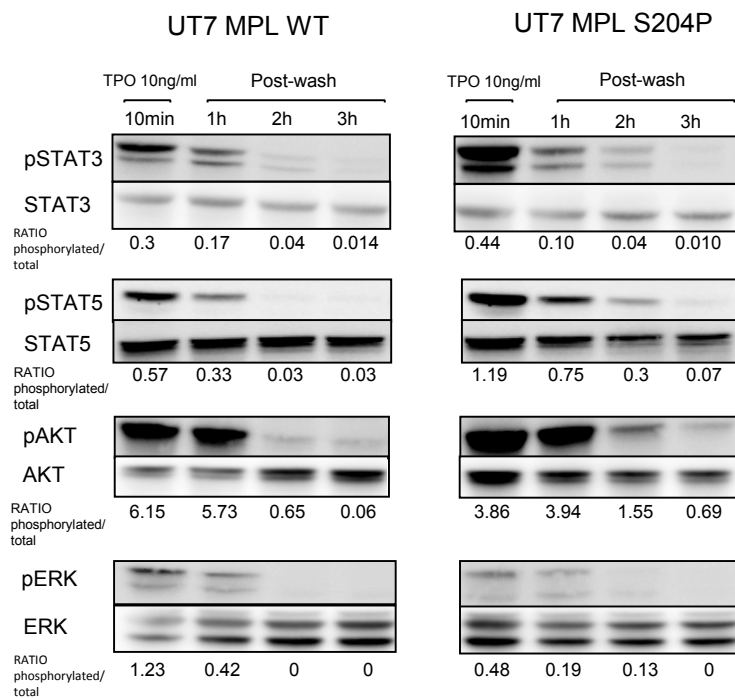


Figure 5.

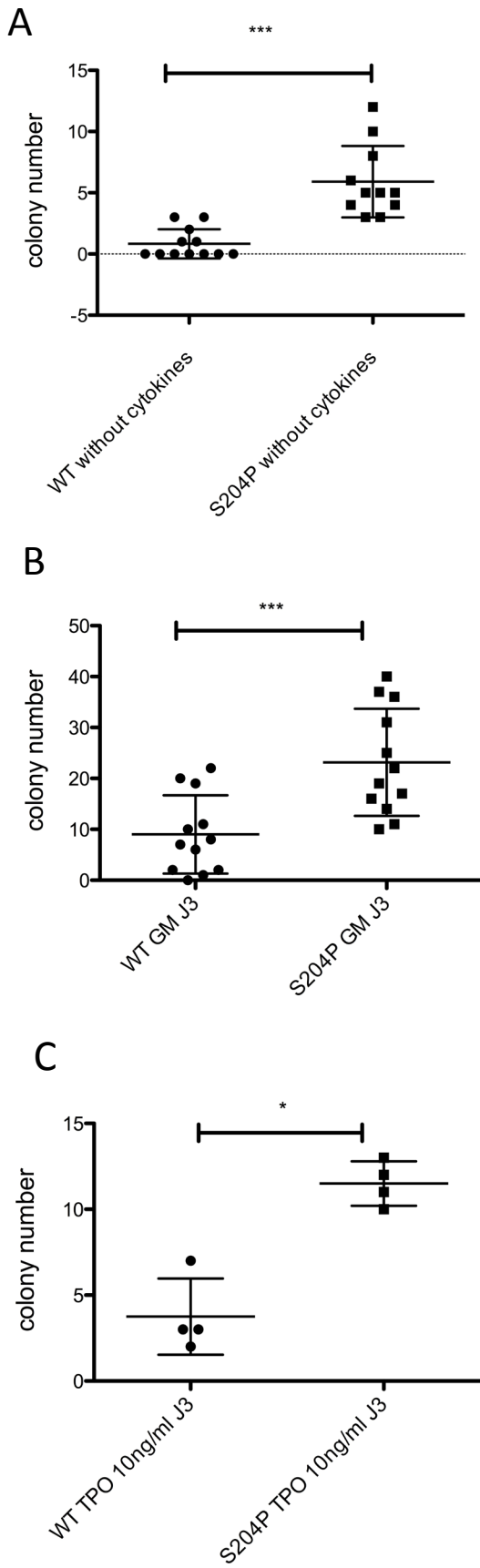
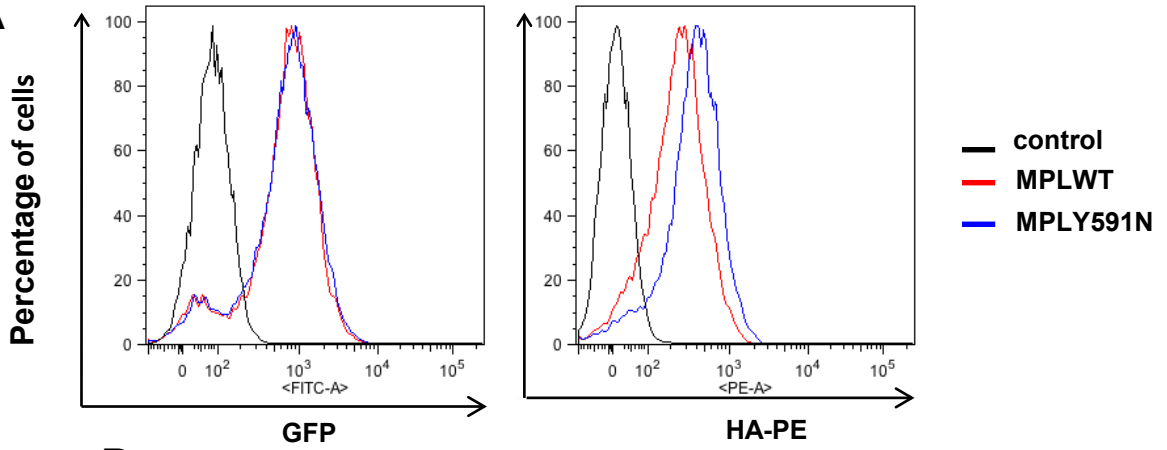
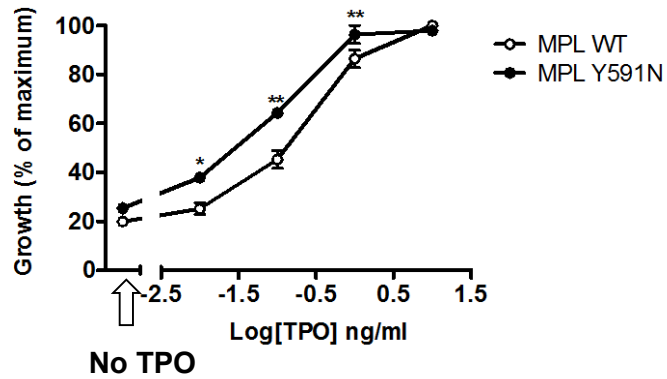


Figure 6.

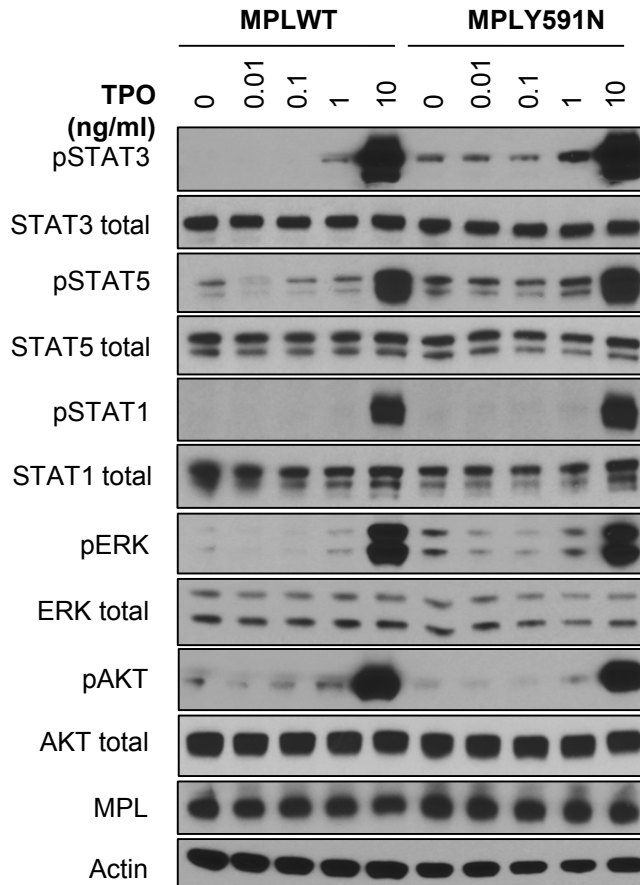
A



B



C





blood

Prepublished online October 8, 2015;
doi:10.1182/blood-2015-07-661983

Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple negative essential thrombocythemia patients

Xénia Cabagnols, Fabrizia Favale, Florence Pasquier, Kahia Messaoudi, Jean Philippe Defour, Jean Christophe Ianotto, Christophe Marzac, Jean Pierre Le Couédic, Nathalie Droin, Ilyas Chachoua, Remi Favier, M'boyba Khadija Diop, Valérie Ugo, Nicole Casadevall, Najet Debili, Hana Raslova, Christine Bellanne-Chantelot, Stefan N. Constantinescu, Olivier Bluteau, Isabelle Plo and William Vainchenker

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Advance online articles have been peer reviewed and accepted for publication but have not yet appeared in the paper journal (edited, typeset versions may be posted when available prior to final publication). Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

Discussion et perspectives

1. ERYTHROCYTOSES

1.1. Erythrocytose et PV : diagnostic différentiel

Les érythrocytoses sont des pathologies rares qui touchent exclusivement la lignée érythroïde. Elles se traduisent par une polyglobulie isolée qui peut se compliquer d'un syndrome d'hyperviscosité ou de thromboses. Leur présentation clinique peut donc mimer celle d'une PV, notamment des PV avec mutation de l'exon 12 de *JAK2*. Il s'agit cependant de pathologies polyclonales qui n'évoluent pas en MF ou LAM secondaire. Leur prise en charge thérapeutique consiste en la réalisation de saignées afin de diminuer le risque de complications thromboemboliques et l'administration d'un traitement myélofreinateur est contre-indiquée, contrairement aux PV. Si par le passé le diagnostic différentiel entre érythrocytose et PV pouvait être délicat, il est aujourd'hui grandement facilité par la découverte d'anomalies moléculaires spécifiques des NMP. En effet, plus de 95% des PV sont dues à des mutations de *JAK2*, V617F et exon 12, et leur recherche, réalisée en routine, permet de poser aisément le diagnostic de la quasi-totalité des cas de PV. En présence d'une polyglobulie sans mutation de *JAK2*, la réalisation d'une BOM permet de mettre en évidence un éventuel aspect de NMP. Si celle-ci est normale et que les causes de polyglobulies secondaires ont été éliminées par les examens de première intention (gaz du sang, échographie abdominale, imagerie cérébrale), la recherche de mutations impliquées dans les érythrocytoses est justifiée. Le taux d'EPO circulant permet de discriminer les érythrocytoses secondaires (taux d'EPO élevé) des érythrocytose primitives (taux d'EPO normal ou bas). Dans 10% à 15% des érythrocytoses primitives familiales, des mutations constitutives d'*EPOR* sont retrouvées [384] [385]. La majorité des anomalies génétiques à l'origine de ces maladies n'est donc pas connue.

1.2. Mutations germinales d'EPOR dans les érythrocytoses primitives

Une vingtaine de mutations d'*EPOR* ont été rapportées dans la littérature, concernant 10% à 15% des cas d'EPF étudiées [384] [385]. Il s'agit en majorité de mutations non-sens et faux-sens, responsables de l'apparition d'un codon STOP prématuré et de l'amputation d'une partie variable de la partie intra-cytoplasmique du récepteur. Nous avons étudié, dans un cas d'érythrocytose primitive, une nouvelle mutation constitutive d'*EPOR*, c.1300dupC (p.Gln434Profs*11), responsable de la perte des 65 derniers AA de la partie C-terminale du récepteur.

Les données de la littérature montrent que ces mutations d'EPOR entraînent une hypersensibilité à l'EPO des lignées cellulaires exprimant stablement ces mutants ainsi que des progéniteurs de patients, sans pousse autonome [398] [382] [381] [399] [365] [392] [386] [400] [392] [387] [349] [348], ce que nous avons effectivement observé pour EPOR p.Gln434Profs*11. Cependant, l'hypersensibilité à l'EPO des Ba/F3 exprimant le récepteur muté EPOR FS était majeure, tout comme celle des progéniteurs érythroïdes de la patiente. En effet, les traces de la cytokine présentes dans le sérum suffisaient à induire leur prolifération et la réalisation de cultures en milieu semi-solide en absence de sérum ont été nécessaires pour discriminer une hypersensibilité majeure à l'EPO d'une vraie pousse autonome, soulignant le phénotype particulier de cette patiente.

Une des hypothèses évoquée dans la littérature pour rendre compte de cette réponse anormale à l'EPO est que l'amputation de la partie C-terminale d'EPOR, entraînant la perte de sites de régulation négative du signal, provoquerait une activation anormale du récepteur, ainsi que celle des voies de signalisation en aval, donc un excès de production des globules rouges [386]. Nous avons cependant montré, grâce au mutant EPOR STOP, que la seule amputation de la partie intra-cytoplasmique du récepteur et donc la perte de 6 des 8 tyrosines conservées, bien qu'entraînant une activation prolongée de STAT5, ne suffisait pas à provoquer une hypersensibilité à l'EPO. La nouvelle séquence peptidique, due au décalage du cadre de lecture, est donc responsable de la réponse anormale à la cytokine, ce qui n'a jamais été évoqué dans la littérature. Une autre théorie est que l'internalisation et la dégradation d'EPOR pourraient être altérées par ces mutations [386] [390] [353] [348] [349]. Cependant, nos résultats montrent que l'internalisation du récepteur EPOR FS n'était pas modifiée par rapport à celle du récepteur sauvage. Nous avons observé que le décalage du cadre de lecture entraînait la perte d'un résidu dileucine qui peut être impliqué dans l'endocytose liée aux clathrines des récepteurs à cytokines. Cependant, la perte de ce motif ne modifiait pas la réponse à l'EPO des Ba/F3 EPOR WT et STOP. Il apparaît donc que ni la perte des sites de régulation négative du signal, ni une altération de l'internalisation du récepteur n'expliquent l'hypersensibilité majeure à l'EPO provoquée par EPOR p.Gln434Profs*11. L'expression augmentée à la surface cellulaire et la plus grande stabilité du récepteur muté pourraient être dues à des modifications de conformation induites par la nouvelle séquence peptidique en aval du décalage du cadre de lecture. La perte de la lysine en position 453, nécessaire au routage du récepteur vers les lysosomes [345] pourrait aussi entraîner une localisation anormale du récepteur après son internalisation et, éventuellement, augmenter son recyclage à la surface. Aucune étude de la localisation des mutants d'EPOR après leur internalisation n'a été réalisée dans la littérature.

Il semble que toutes les mutations d'EPOR ne soient pas fonctionnellement équivalentes [386]. Si nous avons pu écarter les hypothèses de la perte de domaines de régulation de

signal et d'un défaut d'internalisation pour EPOR p.Gln434Profs*11, ces théories pourraient cependant être applicables à d'autres mutants.

D'autre part, quelques substitutions ont également été décrites dans le cadre d'érythrocytose. Nous avons identifiée l'une d'elle, EPOR P488S, dans une famille de « vrais » NMP, soulignant que leur implication dans la physiopathologie des érythrocytoses doit être confirmée.

Il semble important de continuer le travail d'identification et de caractérisation fonctionnelle des mutations d'EPOR dans les érythrocytoses primitives, afin de mieux comprendre le développement de ces pathologies. D'autre part, comme il s'agit de pathologies érythroïdes pures, leur étude pourrait améliorer notre compréhension de l'érythropoïèse pathologique et donc de l'érythropoïèse normale.

2. MECANISMES DE PREDISPOSITION AUX NMP FAMILIAUX

L'existence d'agrégations familiales de NMP [220], l'augmentation du risque de développer un NMP lorsqu'un apparenté au premier degré en est atteint [203] ainsi que l'accumulation d'anomalies moléculaires acquises chez un même sujet [173] sont des arguments en faveur de l'existence d'une prédisposition génétique aux NMP.

2.1. Les prédispositions aux NMP familiaux n'induisent pas de phénotype mais favorisent leur développement

Le mode de transmission est généralement AD à pénétrance incomplète [219] [220] [218] et, bien qu'un phénomène d'anticipation ait pu être observé dans certaines familles [218] [221], le diagnostic est, dans la grande majorité des cas, porté à l'âge adulte [219] [220]. Il apparaît donc que les prédispositions aux NMP familiaux ne sont pas directement responsables du phénotype [238] [237] mais favorisent le développement du NMP, en créant une instabilité génétique responsable de l'acquisition d'anomalies oncogéniques et/ou en constituant un environnement génétique favorable à l'émergence de clones mutés préexistants. La première de ces théories est illustrée par les mutations germinales de *RBBP6*, mises en évidence dans des cas familiaux de NMP, essentiellement de MFP. Bien que leur mécanisme d'action dans la prédisposition aux NMP doive être clarifié, ces mutations semblent altérer la voie d'apoptose p53 et pourraient donc créer un terrain d'instabilité génétique favorable à l'apparition de mutations driver des NMP [238]. L'étude d'une duplication germinale de 700kb transmise au sein de 4 familles de NMP de même origine géographique, avec une pénétrance de 80%, a révélé un mécanisme de prédisposition reposant sur une duplication au sein de laquelle deux gènes, *ATG2B* et *GSKIP*, entraînent non seulement un phénotype mégacaryocytaire (pousse spontanée des progéniteurs) mais surtout amplifient les effets de mutations de signalisation comme *JAK2V617F*, *CALR* ou *MPL*, créant un environnement génétique favorable à leur dominance clonale [237]. De manière similaire, malgré une ségrégation familiale du variant P488S d'EPOR avec le phénotype de NMP, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence d'effet significatif de ce récepteur muté sur le phénotype des lignées cellulaires ou des cellules primaires, suggérant qu'EPOR P488S constituerait un avantage pour la progression de NMP *JAK2V617F* positif, auquel il est systématiquement associé chez les sujets malades de la famille. Le seul argument que nous avons aujourd'hui est l'activation de STAT5 par EPOR P488S suggérant qu'il pourrait coopérer avec d'autres oncogènes activant faiblement cette voie, comme *JAK2V617F*, de manière semblable à ce qui a été démontré lors de l'étude de la duplication.

Le développement de modèles murins et/ou d'iPSC pourrait permettre d'étudier cette hypothèse.

2.2. Diversité et complexité des prédispositions aux NMP familiaux

L'absence d'effet aisément identifiable sur l'hématopoïèse représente donc une des difficultés de l'étude de la prédisposition au NMP. Un autre obstacle est la diversité attendue de ces mécanismes. Il existe en effet plusieurs arguments en faveur d'une grande hétérogénéité génétique à l'origine de ces hémopathies familiales.

2.2.1. Diversités clinique et biologique des NMP familiaux

Tout d'abord, les familles de NMP ont des présentations cliniques variées, associant un ou plusieurs type(s) de NMP (TE, PV, MF) [220] [222] [218]. Selon le *locus* de prédisposition, un ou plusieurs types de NMP pourraient donc être favorisés, comme cela a pu être démontré récemment pour certains SNP associés au risque de développer un NMP dans la population générale (rs12339666 (*JAK2* 46/1) et PV, rs9376092 (*HBSIL-MYB*) et TE) [109]. De plus, des cas de LMC et de mastocytoses sont observés dans certaines familles, suggérant que la prédisposition pourrait soit coopérer avec des anomalies de signalisation communes à ces pathologies ou bien avec plusieurs oncogènes identifiés dans les NMP, incluant BCR-ABL et c-kit, soit induire un phénotype d'hyper-mutabilité, favorisant l'apparition d'anomalies génétiques variées.

L'hétérogénéité du mode de transmission, bien que le plus souvent AD, la pénétrance de la maladie et l'existence ou non d'un phénomène d'anticipation dans différentes familles décrites [219] [220] [218] [203] [221] suggèrent également une variabilité des mécanismes de prédisposition.

D'autre part, si les cas familiaux de NMP présentent globalement le même spectre d'anomalies génétiques acquises que les cas sporadiques, leur distribution intrafamiliale et leur charge allélique peuvent être différentes d'une famille à l'autre et présenter des singularités par rapport aux cas sporadiques. Par exemple, tous les sujets atteints de la famille EPOR P488S présentent uniquement la mutation *JAK2*V617F alors que la fréquence des anomalies de signalisation est superposable à celle des cas sporadiques dans le cas de la prédisposition impliquant *ATG2B* et *GSKIP*. En revanche, les anomalies de l'épigénétique sont plus fréquentes dans les familles de la duplication avec presque 40% de mutations *TET2* vs 15% dans les cas sporadiques [237]. On peut donc supposer que selon le mécanisme de prédisposition, l'apparition de certaines anomalies moléculaires impliquées dans le développement des NMP serait favorisée.

2.2.2. Diversité des *loci* et des mécanismes de prédisposition aux NMP familiaux

Si on ne peut exclure que des mécanismes de prédisposition puissent être communs à plusieurs familles, il semble que certains locus ne permettront d'expliquer l'agrégation qu'au sein d'une famille particulière, ce qui semble être le cas pour la duplication puisqu'un effet fondateur a été mis en évidence dans les 4 familles et que la recherche de la duplication dans 199 échantillons d'ADN de sujets de même origine géographique et dans 98 cas familiaux de NMP d'origine caucasienne s'est révélée négative [237].

D'autre part, nous avons vu que les différents *loci* de prédisposition semblent avoir des mécanismes différents. En effet, les mutations de *RBBP6* semblent être à l'origine d'un terrain d'instabilité génétique favorable à l'apparition de mutations oncogéniques par altération de la voie d'apoptose p53 [238], alors que la duplication, par coopération avec des mutations de signalisation potentiellement préexistantes comme *JAK2V617F*, *CALRm* et *MPLm* [237], pourrait modifier le comportement de ces cellules anormales, favorisant leur expansion clonale. Plusieurs études ont en effet démontré l'existence de mutations *JAK2V617F* au sein d'une hématopoïèse clonale chez des sujets totalement asymptomatiques [206] [415] [205]. Un mécanisme semblable est évoqué pour EPOR P488S, sur la base d'une activation spontanée de STAT5, qui pourrait coopérer avec *JAK2V617F*.

Cependant, il apparaît qu'un seul et même locus de prédisposition pourrait également agir par différents mécanismes pour favoriser l'apparition d'hémopathies myéloïdes variées, puisqu'un grand nombre d'anomalies moléculaires et différentes hémopathies malignes, incluant non seulement des NMP mais aussi des LMMC, des SMD et des LAM, ont été mises en évidence dans les 4 familles de la duplication.

Cette diversité des mécanismes de prédisposition est illustrée dans d'autres hémopathies myéloïdes malignes familiales de transmission AD, les SMD/LAM. Dans ces pathologies, des mutations de plusieurs facteurs de transcription ont été décrites. La FDP/AML (familial platelet disorders/acute myeloid leukemia) est une maladie familiale plaquettaire avec thrombopénie et dysmégacaryopoïèse, qui prédispose aux LAM. Cette prédisposition est due à des mutations hétérozygotes germinales de *RUNX1*. Il s'agit soit de mutations non-sens ou faux-sens au niveau du domaine RHD (runt homology domain) N-terminal de *RUNX1*, altérant la liaison de la protéine mutée à l'ADN, celle-ci se comportant alors comme un dominant négatif, soit de larges délétions ou de mutations entraînant un décalage du cadre de lecture conduisant à une haploinsuffisance [416] [417]. Des mutations hétérozygotes du facteur de transcription *GATA2* ont également été décrites. Il s'agit également de mutations perte de fonction touchant un des domaines en doigt de zinc de

GATA2, responsables d'une altération de la liaison à l'ADN [418] [419] [420]. Une étude a également mis en évidence une mutation hétérozygote de *CEBP α* dans une famille de LAM. Enfin, plus récemment des anomalies germinales de *DDX41*, une hélicase, ont été rapportées, également dans des familles de SMD/AML. Les mécanismes de prédisposition à ces hémopathies malignes sont donc variés et apparaissent différents de ceux identifiés jusqu'alors dans les NMP.

2.3. Conclusion

Les facteurs de prédisposition aux NMP familiaux, plus rares que ceux observés à l'échelle de la population générale comme l'haplotype 46/1 [210] [211] ou TERT rs2736100 [216] [217] [109], apparaissent donc comme extrêmement variés, aussi bien d'un point de vue quantitatif, puisque de nombreux *loci* semblent impliqués, que qualitatif. En effet, bien que deux grandes hypothèses soient évoquées concernant leurs mécanismes d'action (instabilité génétique et environnement génétique favorable à l'émergence de mutants préexistants), ces facteurs de prédisposition pourraient avoir des fonctionnements distincts les uns des autres et un seul et même *locus* de prédisposition pourrait avoir de multiples effets. Cette complexité rend donc particulièrement difficile l'étude des prédispositions aux NMP familiaux, qui demeurent mal connus.

L'identification de ces gènes est un enjeu crucial, permettant d'améliorer la compréhension des mécanismes de prédisposition, à la fois dans le cadre des familles de NMP mais aussi de façon générale, puisqu'ils sont souvent impliqués dans des mécanismes biologiques majeurs comme par exemple le vieillissement ou la réparation de l'ADN. Par ailleurs les mécanismes de prédisposition peuvent aboutir à un "état préleucémique" qui pourrait être semblable aux étapes précoces des hémopathies myéloïdes malignes, NMP et LAM, peu connues. Enfin, la compréhension de ces mécanismes devrait également améliorer notre connaissance globale de l'hématopoïèse, normale et pathologique.

3. MUTATIONS DE SIGNALISATION ET DEVELOPPEMENT DES NMP

3.1. NMP triples négatifs et mutations rares de MPL

Les mutations de *JAK2* sont retrouvées virtuellement dans toutes les PV et *JAK2V617F*, *MPLW515/S505N* et les mutations de *CALR* dans la majorité des TE et MFP. Il demeure 10% à 20% de TE et MFP qui ne présentent aucune de ces anomalies et sont dites triples négatives [144] [145] [146]. Afin de compléter le spectre des anomalies moléculaires dans les NMP, la recherche de mutations driver encore non décrites se poursuit chez ces patients triples négatifs. Il est probable que ces anomalies, rares, seront responsables d'une altération de la voie de signalisation récepteur à cytokines de type I-JAK2, qui a un rôle central dans le développement des NMP.

Nous avons effectivement mis en évidence, chez des patients triples négatifs, deux mutations de *MPL*, S204P dans la partie extracellulaire et Y591N dans la région C-terminale du récepteur. L'altération de ces deux résidus avait déjà été rapportée dans la littérature. En effet, *MPL* S204P et S204F avaient été précédemment observés dans 2 cas de MFP [407] [408] et *MPLY591D* avait été retrouvé dans un cas de PV, associé à une mutation hétérozygote *JAK2V617F* [408], ainsi que chez un patient atteint de TE, muté *CALR* (notre étude), soulignant une fonction particulière de ces résidus dans la signalisation du récepteur à la TPO. Leur mise en évidence souligne l'importance de réaliser un séquençage complet de *MPL* lors de la recherche de nouvelles mutations driver chez les patients triples négatifs.

L'étude fonctionnelle de ces deux mutations rares de *MPL* a révélé un effet faible sur la signalisation et la réponse à la TPO, contrairement aux mutations *MPL* W515L/K/S/R/A et S505N, qui entraînent une activation spontanée du récepteur et une indépendance à la cytokine [134] [137] [138] [139]. Le gain de fonction faible dû à ces mutations est également souligné par la présence concomitante d'autres anomalies génétiques, suggérant qu'elles ne peuvent seules entraîner le développement d'un NMP. En effet, *MPLS204P* était associée chez un des patients de notre étude à une mutation d'*ASXL1*, dont l'implication dans la progression de la maladie et le caractère pronostique péjoratif ont été décrits [190], et chez un autre à une mutation d'une hélicase à ARN, *HELZ*. *MPLY591N* a été mis en évidence dans le contexte particulier de NMP familiaux, associé à un mécanisme de prédisposition responsable d'un phénotype de TE de mauvais pronostic, avec une évolution particulièrement rapide en LAM [237]. Dans la PV, il a été démontré que les mutations *JAK2* exon 12 représentaient un gain de fonction supérieur à *JAK2V617F* et était associées à un meilleur pronostic [115]. Les mutations de *MPL* que nous avons étudiées étant rares, il est hasardeux de conclure à leur éventuel impact pronostique. Cependant, on peut émettre l'hypothèse que, pour qu'un NMP se développe dans le cadre de mutations de signalisation

faibles, leur dominance clonale doit être favorisée par la présence d'anomalies génétiques additionnelles, souvent associées à un pronostic péjoratif. Au contraire, les mutations de signalisation plus fortes (comme les mutations *JAK2* exon 12), capables d'induire seules un phénotype, seraient associées à un meilleur pronostic.

3.2. Mécanismes de développement des NMP

L'activation anormale du complexe récepteur à cytokines de type 1 homodimérique/*JAK2* et des voies de signalisation en aval est centrale dans le développement des NMP, que ce soit pour les mutations de *JAK2* [95-98] [115], *MPLW515/S505N* [134] [137] [138] [139] ou de *CALR* [144].

Cependant, cette activation anormale n'explique pas à elle seule le développement des NMP, comme en témoignent les mutations germinales de *JAK2* [231] [232] [233] [234], *MPL* [139], *EPOR* [366] ou *CSFR3* [421]. En effet, bien qu'elles soient responsables d'une activation non régulée de la signalisation en aval des récepteurs, elles sont retrouvées exclusivement dans des pathologies polyclonales, les thrombocytoses, érythrocytoses et neutrophilies familiales. Ces mutations et celles observées dans les « vrais » NMP, bien que touchant les même molécules et activant les même voies de signalisation, ne sont donc pas équivalentes. De même, dans les PV, il a été démontré que les mutations *JAK2V617F* et *JAK2* exon 12 n'étaient pas similaires : les mutations *JAK2* exon 12 entraînent en effet un gain de fonction supérieur à celui provoqué par *JAK2V617F* et sont associées à un phénotype proche des érythrocytoses, avec un meilleur pronostic [115]. Ces observations soulignent l'importance du contexte génétique dans lesquels se développent les NMP.

D'autre part, il peut sembler paradoxal que des mutations de *MPL*, bien que différentes, soient observées à la fois dans les thrombocytoses familiales et dans les NMP, alors qu'aucune mutation d'*EPOR* n'ait été associée au développement de PV, dont la symptomatologie principale est la polyglobulie. Ceci pourrait être dû à son expression qui est restreinte aux stades tardifs de l'érythropoïèse, contrairement à *JAK2* qui est présent dans toute l'hématopoïèse myéloïde et à *MPL*, présent dès les stades précoces de la mégacaryopoïèse. La durée et l'amplitude de la signalisation d'*EPOR*, différentes de celles de *MPL*, pourraient également être impliquées.

Les mutations de *MPL* [134] et de *CALR* (Marty ASH 2014), qui altèrent spécifiquement les voies de signalisation en aval du récepteur à la TPO, sont observées dans les TE et les MFP [140] [144], pathologies de la lignée mégacaryocytaire. D'autre part, il semble que les mutations de *CALR* ne soient pas toutes équivalentes en terme de phénotype dans les TE [148]. *JAK2V617F* est retrouvée dans les 3 NMP, PV, TE et MFP. Se pose donc la question de savoir comment une seule mutation peut être responsable du développement de

plusieurs phénotypes. Différentes hypothèses, concernant essentiellement *JAK2V617F*, ont été avancées dans la littérature. Les variations de la charge allélique de *JAK2V617F* semblent favoriser soit l'apparition de TE (niveau d'expression faible), soit celui de PV (haut niveau d'expression) [104] [105] [106]. D'autre part, le phénotype varie également selon les molécules de signalisation qui interagissent avec *JAK2V617F* (STAT5 dans les PV, STAT1 dans les TE) [107]. Par ailleurs, l'association avec des mutations de gènes impliqués dans la régulation épigénétique et de l'épissage, ainsi que l'ordre d'apparition de ces anomalies influent sur le phénotype de la maladie [179] [112] [113]. Enfin, il existe, au sein de la population générale, différents facteurs prédisposant au développement des NMP. Tous ne favorisent pas le même phénotype : l'haplotype 46/1 est plus fréquemment associé aux NMP mutés *JAK2V617F* [210] [211] ou *MPLW515X* [212], TERT rs2736100 aux NMP triples négatifs. rs12339666 (*JAK2* 46/1) favoriserait quant à lui le développement des PV alors que rs9376092 (*HBSIL-MYB*) est plus fréquemment observé dans les TE [109]. Il est probable que d'autres SNP seront prochainement identifiés. Toutes ces hypothèses ne sont pas exclusives, soulignant la complexité génétique de ces pathologies.

Ces observations montrent également que les étapes précoces du développement des NMP demeurent peu connues. En effet, si les mutations de signalisation expliquent la production anormale de cellules sanguines matures caractéristiques des NMP, l'existence, chez un même individu, de plusieurs clones indépendants porteurs d'anomalies génétiques différentes [200] [201] [202] souligne le fait que ces mutations driver ne sont pas les événements initiateurs de la maladie. La mise en évidence de facteurs de prédisposition que ce soit dans la population générale ou dans le cadre des NMP familiaux, indique que le fond génétique est impliqué dans l'apparition de ces maladies. Il est donc crucial de poursuivre le travail d'identification de ces facteurs et de leurs mécanismes. D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence, chez des sujets sains, la présence d'une hématopoïèse clonale associée à des mutations somatiques driver des hémopathies malignes, augmentant avec l'âge (moins de 1% de la population avant 50 ans et environ 20% des sujets de plus de 90 ans). Les plus fréquentes sont des mutations de *DNMT3A* [206] [415] [205], dont la perte de fonction est associée à une amplification du compartiment des CSH par altération de leur capacité de différenciation [188]. Des mutations de *TET2*, d'*ASXL1*, de *JAK2* [206] [415] [180] [207] [208] [209] et de régulateurs de l'épissage (*SF3B1*, *SRSF2*) [205] ont aussi été observées. La présence d'une hématopoïèse clonale est associée à un risque, néanmoins faible, de développer une hémopathie maligne myéloïde } [415]. Il a également été observé que le vieillissement provoquait des modifications des CSH (accumulation de coupures double-brin de l'ADN non réparées, raccourcissement des télomères, modification des capacités d'auto-renouvellement et de prolifération) [422] [423] [424] ainsi que de la niche hématopoïétique [425]. Ces modifications pourraient favoriser la sélection de certains clones avec l'âge, favorisant le développement d'hémopathies

myéloïdes. Le vieillissement du système hématopoïétique pourrait être un facteur d'initiation des NMP, pouvant favoriser l'expansion clonale ou modifier le comportement de cellules mutées, présentes chez des sujets non atteints.

Liste des publications

1. Xénia Cabagnols*, Fabrizia Favale*, Florence Pasquier*, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple negative Essential Thrombocythemia Patients. *Blood*. *Accpeté*.
2. Saliba J, Saint-Martin C, Di Stefano A, Lenglet G, Marty C, Keren B, Pasquier F, et al. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2015 Aug 17.
3. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, Girodon F, Alexandre JH, Mansier O, Viallard JF, Lippert E, Murati A, Mozziconacci MJ, Saussoy P, Vekemans MC, Knoops L, Pasquier F, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2015.
4. Pasquier F, et al. Myeloproliferative neoplasms: JAK2 signaling pathway as a central target for therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014 Sep;14 Suppl:S23-35. Review

Liste des communications

Florence Pasquier, Sarah Grosjean, Frédérique Verdier, Caroline Marty, Nicole Casadevall, Claude Préhu, William Vainchenker, Christine Bellanné-Chantelot, Isabelle Plo. L'expression d'un récepteur à l'érythropoïétine tronqué ne suffit pas à induire une érythrocytose. Communication orale. *Club du globule rouge et du fer*. Septembre 2015.

Florence Pasquier, Sarah Grosjean, Caroline Marty, Nicole Casadevall, William Vainchenker, Christine Bellanné-Chantelot, Isabelle Plo. Mécanisme d'induction d'une érythrocytose par un nouveau mutant du récepteur à l'EPO. Poster. *Société Française d'Hématologie*. Mars 2015.

Annexes

Annexe 1 :

Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution

REFERENCES

- O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA *et al.* Acute myeloid leukemia, version 2. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; **11**: 1047–1055.
- Mattison R, Luger S, Lazarus H. New strategies for the evaluation of the nadir bone marrow following induction in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 2013; **20**: 93–99.
- Hussein K, Jahagirdar B, Gupta P, Burns L, Larsen K, Weisdorf D. Day 14 bone marrow biopsy in predicting complete remission and survival in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2008; **83**: 446–450.
- Morris TA, DeCastro CM, Diehl LF, Gockerman JP, Lagoo AS, Li Z *et al.* Re-induction therapy decisions based on day 14 bone marrow biopsy in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2013; **37**: 28–31.
- Yanada M, Borthakur G, Ravandi F, Bueso-Ramos C, Kantarjian H, Estey E. Kinetics of bone marrow blasts during induction and achievement of complete remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008; **93**: 1263–1265.
- Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A *et al.* Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Group study. *Blood* 2000; **96**: 4075–4083.
- Othus M, Sudipto M, Sekeres M, Godwin J, Anderson J, Petersdorf S *et al.* Prediction of CR on reinduction in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia given intensive induction regimens; a report from SWOG and Cleveland Clinic. *Blood* 2013 **122**: 3924 (ASH Abstract 2013).
- Vainstein V, Buckley SA, Shukron O, Estey EH, Abkowitz JL, Wood BL *et al.* Rapid rate of peripheral blood blast clearance accurately predicts complete remission in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2014; **28**: 713–716.

Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution

Leukemia (2015) **29**, 249–252; doi:10.1038/leu.2014.270

Recent advances in myeloproliferative neoplasms (MPNs) have highlighted the prevalence of mutations in the calreticulin gene (*CALR*),^{1,2} bringing a major new actor in these disorders. Numerous studies have highly contributed to understanding of the role of *JAK2* and *MPL* in the pathogenesis of MPN development and progression.^{3–5} In contrast to *JAK2* mutations that are associated in a causative manner with polycythemia vera,⁶ myelofibrosis (MF) or essential thrombocytemia (ET),⁷ *CALR* mutations are only associated with ET and MF. Indeed, *CALR* mutations were reported in 25% of ET and in 35% of MF patients who were non-mutated for *JAK2* and *MPL*. All recurrent *CALR* mutations that have been observed lead to a frame-shift generating a common 36 amino-acid C-terminal end and loss of the KDEL motif.^{1,2,8–11} Among these mutations, two variants are largely predominant: type 1, a 52-bp deletion (p.L367fs*46) and type 2, a 5-bp insertion (p.K385fs*47). They account for 85% of the *CALR* mutations in ET and primary myelofibrosis (PMF).^{1,2} There is strong evidence that the clinical features of *CALR* and *JAK2*-mutated ET and PMF are different and represent two facets of these disorders, although they both activate the JAK/STAT signaling pathway. It remains possible that the different *CALR* mutants exert different signaling activities. Thus, it would be important to characterize the potential differences between the different *CALR* mutations and also the phenotype of MPN devoid of *JAK2*, *MPL* and *CALR* mutations, now called triple-negative MPNs to understand whether they represent a homogeneous population.

A total of 572 MPN patients negative for *JAK2* and *MPL* mutations were collected according to sex, age at diagnosis and main clinical characteristics from several French and Belgian hospitals under the auspices of French Intergroup of Myeloproliferative disorders. The mutational status of *CALR* was determined using previously described high-resolution sizing of fluorescent dye-labeled PCR amplification of exon 9, with Sanger sequencing controls.¹ Beyond its contribution to mutant detection, high-resolution sizing also allows to estimate the allelic burden. Laboratory data and clinical parameters were obtained at diagnosis. The GraphPad Prism statistical package (GraphPad

Software, Inc., La Jolla, CA, USA) was used to perform statistical analysis on these data, as described in Supplementary Information.

The median age at diagnosis of the entire patient series was 59 years (range, 7–92); 241 were males (43.1%). In our series, 396 patients were diagnosed as ET (including potential unidentified prefibrotic stage of myelofibrosis), 108 as MF (including PMF and post-ET MF) and 68 as mixed myelodysplastic syndrome (MDS)/MPN. We identified mutations localized in exon 9 of *CALR* in 368 patients (63.3%). The remaining 204 patients were designated as triple negative.

The global distribution of *CALR* mutations in our series was similar to previous studies^{1,2} with 206 type 1 mutations (56%), 119 type 2 mutations (32%) and 43 other mutations (12%) representing 17 different *CALR* variants (Figure 1a). Importantly, nine were previously described but eight represented new variants (Figure 1b). Notably one of them, p.Glu378Cysfs*36, shortened the consensus C-terminal end to 33 amino acids only. In contrast to the rather low numbers of *JAK2* and *MPL* mutation variants, the growing number of *CALR* genomic variants identified implies that these mutants might not be completely biologically equivalent, despite the common loss of the KDEL motif and the acquisition of a new functional domain. Differences in the sequence of the C-terminal domain could indeed reach up to 25 amino acids, which is predicted to change the properties of the protein.

Our striking result is the distribution of *CALR* mutation type according to the MPN type. In MF there is an overrepresentation of type 1 *CALR* mutation (70%) and an underrepresentation of type 2 *CALR* mutation (13%) as compared with patients with ET that have a distribution of *CALR* mutations comparable to the global series of patients (Figure 1a; $P=0.0002$). In MPNs, it has been highlighted that different allelic burdens of *JAK2V617F* and *MPLW515K/L* are associated with different phenotypes.^{4,5} In our series, a higher allelic burden of *CALR* mutation was found in MF ($P < 0.0001$; Table 1). Even if it affects a small number of patients, it is to be noted that a high allelic burden (over 60%) was more frequent in MF (5/35=14.3%) than in ET (6/158=3.8%; $P=0.0256$). This highly suggests the presence of rare homozygous mutations as described by Klampfl.¹ However, and contrary to that study, we observed a high allelic burden mainly

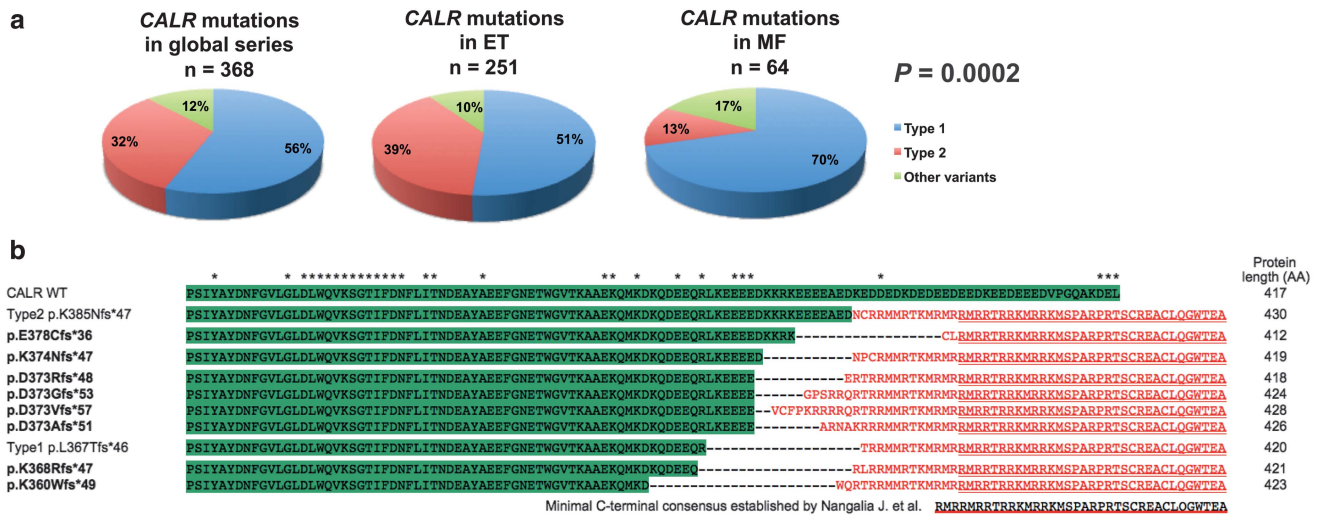


Figure 1. (a) Distribution of *CALR* mutations according to their type in *CALR*-mutated MPNs in the global series, ET and MF. (b) Alignment of *CALR* C-terminal domain in wild-type and mutant proteins. Mutation denomination is indicated on the left (new variants in bold). Green highlighted sequences represent the remaining wild-type amino acids in mutant proteins. Red sequences represent the C-terminal amino acids present in mutants (33 common to all mutants are underlined). A star indicates amino acids that are conserved from *Caenorhabditis elegans* to *Homo sapiens* according to clustalW 2.0 alignment.

for type 1 mutations because no patient with type 2 mutation in ET and only one in MF, had an allelic burden over 60%. On the opposite, patients with a low allelic burden (under 25%) were only observed in ET (19/158=11.9%). Taken together these results suggest a link between *CALR* mutation allelic burden and disease phenotype as it was demonstrated for *JAK2* mutation.

To go further in the characterization of patients with type 1 or type 2 mutations, we sorted clinical characteristics of patients according to their diagnosis, presence or absence of *CALR* mutations and type of mutations (Table 1). These comparisons underscore a quite homogeneous MF group. Patients were mostly men (61%; $P = 0.0009$), the median age at diagnosis was 62.5 with several specific abnormalities including a low hemoglobin concentration (10.1 g/dl; $P < 0.0001$) and a low platelet count (median at $237 \times 10^9/l$; $P < 0.0001$). These results are in line with a recently published series.^{12,13} It is to note, however, that MF patients with type 2 mutation may represent a particular entity characterized by a higher median platelet count as highlighted by an absence of patients with platelet count under $100 \times 10^9/l$. Owing to their rarity it is difficult to have full features of these patients that should be better characterized in future larger series.

Compared with MF, in ET patients the clinical presentation was more heterogeneous. A global overview indicated that they were mostly women (>61%; $P < 0.0001$), the median age at diagnosis was 57; $P = 0.0179$) with a median platelet count of $724 \times 10^9/l$ ($P < 0.0001$). In *CALR*-mutated patients, however, there were no sex prevalence and a more important thrombocytosis ($785 \times 10^9/l$; $P < 0.0001$). The type of *CALR* mutation impacted also age and platelet count. Indeed, patients with type 1 mutation were diagnosed at a median age of 61 with a median platelet count of $731 \times 10^9/l$, whereas those with type 2 mutations were diagnosed younger (median of 52.5 years) with a median platelet count over $870 \times 10^9/l$ ($P = 0.04$).

An important other contribution of our series concerns the clinical parameters of the 204 triple-negative patients. A majority of triple-negative ETs were women (76.9%; $P < 0.0001$). This bias, which was not retrieved in *CALR*-mutated patients, was even more important for young triple-negative ET patients (< 50 years old) that were almost exclusively women (27/28=96.4%; $P < 0.0001$).

This clearly suggests that the prevalence of women in ET is mostly owing to triple-negative cases. In MF, triple-negative patients presented a low hemoglobin concentration (8.85 g/dl; $P = 0.0255$) and a low leukocyte count ($1.995 \times 10^9/l$; $P = 0.0002$). A striking characteristic was their platelet count that was significantly lower than their group mates (563.5 vs $785 \times 10^9/l$ in ET and 108.5 vs $389 \times 10^9/l$ in MF; $P < 0.0001$). This lower platelet count may suggest that in the general population, putative asymptomatic triple-negative ET male patients could be retrieved, which would only be diagnosed at more advanced age with a symptomatic MF.

Taken together, our results underline the differences between the two most frequent types of *CALR* mutation and show that *CALR*-mutated patients should not be considered as a single entity. A recent study suggests a better prognosis for patients with *CALR* type 1 mutation.¹² On the contrary, our results suggest that type 1 is associated with a shorter survival in MF (hazards ratio: 36.35, 95% confidence interval: 4.069–324.7; Supplementary Figure 1). However, these results remain to be confirmed in future larger series. In particular, it would be important to determine whether differences in survival between series could be explained by the presence or absence of mutation in epigenetic modifiers or spliceosome components (giving unfavorable prognosis) in the case of type 2 mutations. Indeed, as this mutation was described as weaker,¹ it could associates to a higher degree with epigenetic mutations in order to induce a MF phenotype, and thus the type 2 mutation *per se* might not be responsible for the prognosis. Of note, in ET patients, the type 2 *CALR* mutation was more frequent than type 1 in young patients and type 2 patients were less frequent than expected in MF. These data strongly suggest a less potent transforming capacity of type 2 variant, as it was initially hypothesized.¹ Taken together these findings suggest an association of type 2 *CALR* mutation with a true ET phenotype. As some of our ET patients could correspond to a prefibrotic stage of MF, and those patients are eventually MF patients with the MF mutational profiles (70% type 1 *CALR* mutation), the difference highlighted by our series of patients could be even more biased toward an increased proportion of type 2 *CALR* mutation in ET. However, longitudinal studies are needed to fully characterize ET patients with type 2 *CALR* mutation, which would clearly impact

Table 1. Clinical and laboratory features of 581 patients negative for JAK2 and MPL mutations

	All patients (n = 572)		ET (n = 396)		MF (n = 108)		P-value global	ET vs MF	ET CALR+ vs ET CALR-	MF CALR+ vs MF CALR-	MF CALR type 1 vs MF CALR type 2
	ET CALR- (n = 145)	ET CALR+ (n = 251)	ET CALR type 1 (n = 129)	ET CALR type 2 (n = 98)	MF CALR- (n = 44)	MF CALR+ (n = 64)					
Allelic burden	N = 234	0.44 (0.09-1)	0.43 (0.09-0.79)	0.43 (0.19-0.54)	0.50 (0.29-1)	0.50 (0.29-1)	<0.0001	<0.0001	0.2907	0.8224	
Allelic burden, >0.6, n (%)	12 (5.1)	6 (3.8)	6 (3.8)	0 (0)	5 (14.3)	5 (14.3)	0.0086	0.0256			
Allelic burden, <0.25, n (%)	23 (9.8)	19 (11.9)	19 (11.9)	4 (4.1)	0 (0)	0 (0)					
Age in years, median (range)	N = 416	59 (7-92)	57 (7-90)	61 (7-87)	62.5 (27-89)	63 (27-84)	0.015	0.0179	0.0672	0.8456	
Age < 50 years, n (%)	128 (30.8)	102 (36.7)	74 (49.1)	36 (43.9)	16 (19)	11 (20.4)	<0.0001	0.0022	0.0062	0.7775	
Males (%)	N = 559	241 (43.1)	148 (38.2)	66 (43.3)	64 (61)	23 (59)	<0.0001	<0.0001	0.2822	0.8353	
Males < 50 years, n (%)	53 (41.4)	41 (40.2)	1 (3.6)	18 (60)	9 (56.3)	1 (20)	<0.0001	0.2803	0.6233	0.1058	
Hemoglobin, g/dl, median (range)	N = 280	12.5 (7.3-20.6)	12.9 (7.3-20.6)	13.2 (9.3-20.6)	10.1 (2.9-15.9)	8.85 (2.9-15.7)	<0.0001	<0.0001	0.6413	0.2132	
Leukocytes, × 10 ⁹ /l, median (range)	N = 265	6.81 (0-35.5)	7 (0-17.28)	7.1 (1.06-13.8)	5.2 (0.18-35.5)	1.995 (0.18-25.72)	<0.0001	0.0027	0.1605	0.0002	
Platelets, × 10 ⁹ /l, median (range)	N = 337	684 (8-3152)	724 (198-2500)	731 (315-2500)	865 (411-1775)	108.5 (10-2623)	<0.0001	<0.0001	0.04	<0.0001	
Hemoglobin < 10 g/dl, n (%)	38 (13.6)	10 (4.6)	6 (7.6)	2 (2.5)	20 (42.6)	9 (64.3)	<0.0001	<0.0001	0.6368	0.0617	
Leukocytes > 10 × 10 ⁹ /l, n (%)	39 (15.1)	25 (12.5)	11 (14.1)	7 (10.1)	12 (24)	3 (16.7)			0.7798	0.4973	
Platelets, > 450 × 10 ⁹ /l, n (%)	257 (79.1)	234 (90.3)	70 (79.5)	87 (94.6)	19 (35.8)	2 (11.1)	<0.0001	<0.0001	0.4737	0.0077	
Platelets, < 100 × 10 ⁹ /l, n (%)	17 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	12 (15.2)	9 (11.4)	ns	ns			
Follow-up, months, median (range)	N = 415	69 (0-528)	72 (2-360)	72 (2-348)	72 (2-360)	48 (4-132)	ns	ns			

Abbreviations: CALR, calreticulin; ET, essential thrombocytemia; MF, myelofibrosis; ns, nonsignificant. Significant P-values < 0.05 are indicated in bold.

the clinical management of CALR-mutated patients according to the mutation type.

Future studies will be important to determine the quantitative or qualitative differences in signaling between type 1 and type 2 CALR mutations, which could be the basis for these phenotypic differences. In addition, according to a recent publication, triple-negative ET are also associated to a JAK/STAT signature.¹⁴ Therefore it will be important to find the rare signaling mutations responsible for these disorders.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank F Fava, C Legrand, I Teyssandier, F Lorre, R Tang and Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires, AP-HP, hôpital Saint-Antoine, Drs D Carp, J Dewulf, S Frederic, L Heuberger, I Leduc, F Lefrere, E Legac, E Ronez, J Roussi, C Salanoubat, J-L Vaerman, M Van Butsel, MD Venon, Professor D Latinne and Professor O Legrand for molecular and clinical biology support. This work was supported by grants from la Ligue contre le Cancer (XC, IP, ES WV and OB, équipe labellisée 2012), from the Agence Nationale de la Recherche (IP, WV ANR Thrombocytosis and GERMPN) and the Laurette Fugain association (WV). XC and OB are supported respectively by grants from the University Paris Diderot and from the ANR. We are grateful for generous support to S.N.C. from the F.R.S.-F.N.R.S., Belgium, the Salus Sanguinis Foundation, the Action de Recherche Concertée ARC10/15-027, the Fondation contre le Cancer, Brussels, and the PAI Program Belgian Medical Genetics Initiative Project P7/43 (BeMG) IAP, Belgium.

X Cabagnols^{1,2,3}, JP Defour^{4,5,6}, V Ugo^{7,8,9}, JC Ianotto⁷, P Mossuz¹⁰, J Mondet¹⁰, F Girodon^{11,12}, JH Alexandre¹¹, O Mansier¹³, JF Viillard¹⁴, E Lippert¹³, A Murati¹⁵, MJ Mozziconacci¹⁵, P Saussoy⁶, MC Vekemans¹⁶, L Knoops⁵, F Pasquier^{1,2,3}, V Ribrag^{1,2,3}, E Solary^{1,2,3}, I Plo^{1,2,3}, SN Constantinescu^{4,5}, N Casadevall^{11,2,17}, W Vainchenker^{1,2,3}, C Marzac^{17,18,19,20} and O Bluteau^{1,2,3,20}

¹UMR 1009 INSERM, Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif, France;

²Gustave Roussy, UMR 1009, Villejuif, France;

³Université Paris-Sud, UMR 1009, Villejuif, France;

⁴Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium;

⁵de Duve Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium;

⁶Department of Clinical Biology, Cliniques universitaires St Luc, Brussels, Belgium;

⁷CHU de Brest, Laboratoire d'Hématologie, Brest, France;

⁸Université de Brest, Faculté de Médecine, Université Européenne de Bretagne, Brest, France;

⁹INSERM U1078, Brest, France;

¹⁰UMR 5525 CNRS- équipe TheRex, Université Joseph Fourier-Grenoble-1 Grenoble, France;

¹¹Laboratoire d'Hématologie, CHU de Dijon, Dijon, France;

¹²INSERM U866, Faculté de Médecine, Dijon, France;

¹³Laboratoire d'Hématologie, CHU de Bordeaux et Laboratoire Hématopoïèse Leucémique et Cibles Thérapeutiques, INSERM U1035, Université de Bordeaux, Bordeaux, France;

¹⁴Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France;

¹⁵Département de Biopathologie et d'Oncologie Moléculaire, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France;

¹⁶Department of Hematology, Cliniques universitaires St Luc, Brussels, Belgium;

¹⁷AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Laboratoire d'Hématologie, Paris, France;

¹⁸Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, GRC n°07, Groupe de Recherche Clinique sur les Myéloproliférations Aiguës et Chroniques MyPAC, Paris, France and

¹⁹INSERM, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, Paris, France
E-mail: christophe.marzac@sat.aphp.fr

²⁰These authors contributed equally to this work.

REFERENCES

- 1 Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD *et al*. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013; **369**: 2379–2390.
- 2 Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC *et al*. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013; **369**: 2391–2405.
- 3 Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; **112**: 2190–2198.
- 4 Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT *et al*. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; **366**: 1945–1953.
- 5 Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D *et al*. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008; **112**: 141–149.
- 6 James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C *et al*. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; **434**: 1144–1148.
- 7 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S *et al*. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; **365**: 1054–1061.
- 8 Chi J, Nicolaou KA, Nicolaidou V. Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia* 2013; **28**: 1152–1154.
- 9 Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I *et al*. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014; **123**: 2220–2228.
- 10 Maffioli M, Genoni A, Caramazza D, Mora B, Bussini A, Merli M *et al*. Looking for CALR mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014; **28**: 1357–1360.
- 11 Rumi E, Harutyunyan AS, Pietra D, Milosevic JD, Casetti IC, Bellini M *et al*. CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood* 2014; **123**: 2416–2419.
- 12 Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH *et al*. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014; **28**: 1472–1477.
- 13 Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, Gangat N, Belachew AA, Lasho TL *et al*. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol* 2014; **89**: E121–E124.
- 14 Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel J, Brunel JP, Mermel CH *et al*. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* 2014; **123**: e123–e133.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

Annexe 2:

**Germline duplication of *ATG2B* and *GSKIP* predisposes to
familial myeloid malignancies**

Germline duplication of *ATG2B* and *GSKIP* predisposes to familial myeloid malignancies

Joseph Saliba^{1-4,14}, Cécile Saint-Martin^{1-3,5,14}, Antonio Di Stefano^{1-4,14}, Gaëlle Lenglet¹⁻⁴, Caroline Marty¹⁻⁴, Boris Keren⁵, Florence Pasquier¹⁻⁴, Véronique Della Valle¹⁻³, Lise Secardin¹⁻⁴, Gwendoline Leroy⁵, Emna Mahfoudhi^{1-4,6}, Sarah Grosjean¹⁻⁴, Nathalie Droin¹⁻³, M'boyba Diop¹⁻³, Philippe Dessen¹⁻³, Sabine Charrier⁷, Alberta Palazzo¹⁻³, Jane Merlevede¹⁻³, Jean-Côme Meniane⁸, Christine Delaunay-Darivon⁸, Pascal Fuseau⁹, Françoise Isnard^{10,11}, Nicole Casadevall^{1,12}, Eric Solary¹⁻³, Najet Debili¹⁻³, Olivier A Bernard¹⁻³, Hana Raslova¹⁻³, Albert Najman^{10,11}, William Vainchenker^{1-4,13,15}, Christine Bellanné-Chantelot^{1-3,5,11,15} & Isabelle Plo^{1-4,15}

No major predisposition gene for familial myeloproliferative neoplasms (MPN) has been identified. Here we demonstrate that the autosomal dominant transmission of a 700-kb duplication in four genetically related families predisposes to myeloid malignancies, including MPN, frequently progressing to leukemia. Using induced pluripotent stem cells and primary cells, we demonstrate that overexpression of *ATG2B* and *GSKIP* enhances hematopoietic progenitor differentiation, including of megakaryocytes, by increasing progenitor sensitivity to thrombopoietin (TPO). *ATG2B* and *GSKIP* cooperate with acquired *JAK2*, *MPL* and *CALR* mutations during MPN development. Thus, the germline duplication may change the fitness of cells harboring signaling pathway mutations and increases the probability of disease development.

Most myeloid malignancies, including acute myeloid leukemias (AML), myelodysplastic syndromes (MDS) and MPN, are sporadic diseases. Familial forms are rare but informative, as germline mutations may phenocopy initiating mutations in sporadic leukemias. Such germline mutations have been identified in *RUNX1* (in a familial platelet disorder that predisposes to AML, or FPD/AML)¹, *CEBPA*² and *GATA2* (refs. 3,4) coding sequences as well as in the 5'UTR of the *ANKRD26* (*THC2*) gene⁵.

Familial cases of MPN are usually transmitted by autosomal inheritance with incomplete penetrance, appear in adulthood and exhibit acquired genetic abnormalities that are similar to those identified in sporadic cases, such as mutations of *JAK2* (encoding p.Val617Phe) and *TET2* (refs. 6,7). The independent acquisition of several oncogenic hits in the same patient with MPN suggested that an unidentified germline predisposition locus might be present in some sporadic cases⁶⁻⁸. For example, the *JAK2* 46/1 haplotype was shown to increase the risk of developing MPN with *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe⁹⁻¹¹, whereas a germline intronic SNP in the *TERT* gene is another susceptibility factor for MPN development^{12,13}. Linkage and segregation analyses indicate that genetic predisposition

to MPN cannot be related to a common alteration and rather involves a number of susceptibility loci responsible for independent familial aggregations. Identification of these susceptibility loci may improve understanding of the mechanisms of predisposition, which might either result in the induction of genetic instability, favoring the acquisition of oncogenic mutations, or correspond to a fertile ground for the selection of somatic mutations.

Here we describe a newly identified germline copy number variation (CNV) that predisposes to several myeloid malignancies, particularly essential thrombocythemia, which can progress to myelofibrosis or leukemia.

RESULTS

Identification of a germline CNV on chromosome 14

We identified two large families (F1 and F2) from the French West Indies with affected individuals having clinical features distinct from those of other familial cases of MPN (Fig. 1). Adult-onset hematological malignancies, including MPN, chronic myelomonocytic leukemia (CMML) and AML, were transmitted in these families with autosomal dominant inheritance (Table 1 and Supplementary Table 1).

¹INSERM, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1170, Villejuif, France. ²Université Paris XI, UMR 1170, Gustave Roussy, Villejuif, France. ³Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁴Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif, France. ⁵Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Département de Génétique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France. ⁶Laboratoire d'Hématologie Moléculaire et Cellulaire (Salem Abbas), Institut Pasteur de Tunis, Belvédère, Tunisia. ⁷Généthon, Evry, France. ⁸Service de Médecine Interne, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Fort de France, Fort de France, France. ⁹Laboratoire d'Hématologie, CHU Fort de France, Fort de France, France. ¹⁰Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Département d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France. ¹¹Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Groupe de Recherche Clinique sur les Myéloproliférations Aiguës et Chroniques (GRC 7, MYPAC), Paris, France. ¹²Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France. ¹³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Consultation d'Immuno-Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France. ¹⁴These authors contributed equally to this work. ¹⁵These authors jointly supervised this work. Correspondence should be addressed to W.V. (verpre@igr.fr), C.B.-C. (christine.bellanne-chantelot@aphp.fr) or I.P. (isabelle.plo@gustaveroussy.fr).

Received 3 March; accepted 21 July; published online 17 August 2015; doi:10.1038/ng.3380

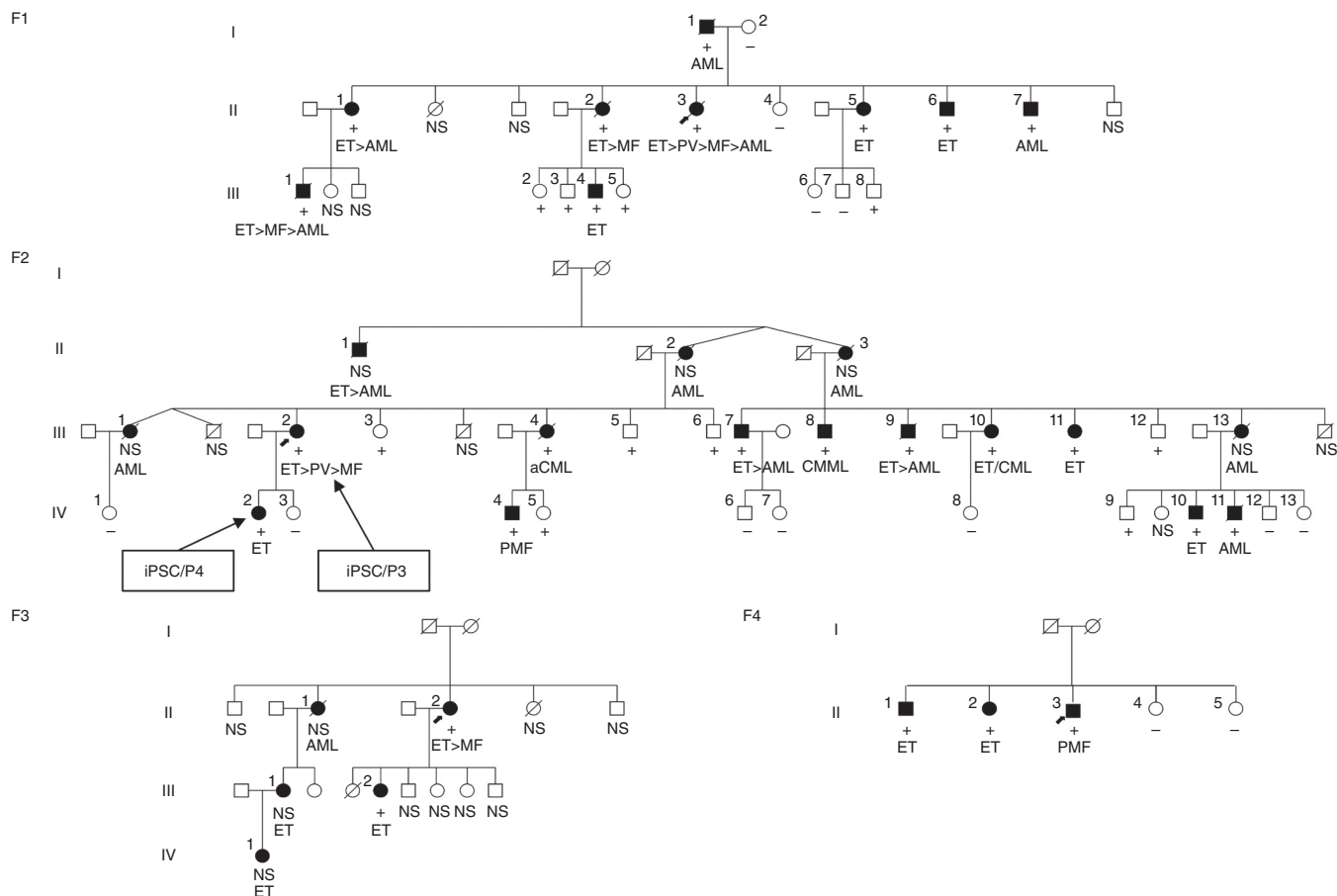


Figure 1 Pedigrees of the four families with MPN. Filled symbols represent cases. Under each symbol, the first line shows the genetic status for the germline CNV (+, the CNV was found; –, otherwise); the second line indicates the phenotype at the time of diagnosis followed by the disease evolution. ET, essential thrombocythemia; PV, polycythemia vera; MF, myelofibrosis; PMF, primary myelofibrosis; AML, acute myeloid leukemia; aCML, atypical chronic myeloid leukemia; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; NS, not studied.

Moreover, two-thirds of the patients (22/33) initially had essential thrombocythemia, with half of them progressing to myelofibrosis or AML. Genetic linkage analysis of the two families identified positive linkage at the 14q32.13-q32.2 locus (logarithm of odds (LOD) score $z_{\max} = 3.7$) (Fig. 2a). Using additional microsatellite markers and taking advantage of a crossing-over event in one patient (F1:II-7) and an ancestral patient from family F2, the susceptibility region was further narrowed down to a 1.86-Mb interval (95.76–97.62 Mb, hg19) (Supplementary Fig. 1a). Complete sequencing of the 1.86-Mb candidate locus did not identify any germline mutation in coding regions that segregated with the disease (data not shown). SNP array analysis detected a 700-kb duplication located within the linkage region and absent from the Database of Genomic Variants (DGVS, v10) (Fig. 2b). We further confirmed the presence of the CNV in all affected cases in both families by quantitative RT-PCR (qRT-PCR; Fig. 1 and Supplementary Table 2). PCR analyses mapped the proximal and distal breakpoints of the CNV and established this duplication as a 700-kb head-to-tail tandem duplication (Fig. 2c,d and Supplementary Table 2). This region includes the genes *TCL1A*, *GSKIP*, *ATG2B*, *BDKRB1* and *BDKRB2*, together with the first exon of *AK7* (Fig. 2e). Using quantitative PCR, we identified in two other families the same CNV with identical breakpoints (families F3 and F4; Fig. 1 and Supplementary Fig. 1b). These families shared with the two initial families their geographical origin and the clinical features of affected individuals. Analysis of the 4 families demonstrated

the high penetrance of the phenotype, as 24 of 34 carriers of the germline CNV developed disease (Fig. 1). Asymptomatic carriers of the CNV were matched by age to patients with MPN and presented no major blood abnormalities (Supplementary Table 3). This CNV was not identified in 199 control DNA samples from individuals with the same geographical origin and 98 unrelated Eurocaucasian familial MPN cases.

Molecular characterization of the familial MPN cases

Analysis of the genetic abnormalities associated with disease development collected from 24 members of these families identified a signaling mutation profile in MPN (essential thrombocythemia or primary myelofibrosis (PMF)) similar to that observed in sporadic cases: cases had *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe (15/22, 68%), *MPL* mutation (2/22, 9%) or *CALR* mutation (4/22, 18%) or were triple negative for these mutations (1/22, 5%) (Fig. 3 and Table 1). Sequencing performed on the most recent samples showed the acquisition of secondary events in *TET2* (7/21, 38%), *IDH1* (2/21, 10%), *IDH2* (4/21, 19%) and *ASXL1* (1/21, 5%) with disease evolution to myelofibrosis and leukemia (Fig. 3 and Table 1). Several patients exhibited biallelic mutation of *TET2* or a combination of epigenetic mutations (in *TET2* and *IDH2* or *IDH1* and *IDH2*; $n = 3/21$, 14%). No *TP53* mutation was detected. Complex karyotypes were observed only when the leukemia occurred.

Table 1 Clinical and molecular data for the four families with MPN

Family	ID	Sex	Initial diagnosis	Age at diagnosis (years)	Follow-up duration (years)	Evolution	Outcome	Signaling mutation (allele burden)	Epigenetic mutation	Karyotype
F1	I-1	Male	AML4	75.4	0.5		Died	NS	NS	46,XY,del(13)(q12q22)[1]/46,XY,del(13)(q12q22),t(1;1)(p34;3p36,3),t(2;20)(p13;q11,2),t(4;12)(q12;q15),add(5)(q35)[16]
F1	II-1	Female	ET	63.5	7.5	AML	Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (45%)	<i>IDH1</i> : c.394C>T, p.Arg132Cys	46,XX,-7[10]/47,-7,+11/46,XX
F1	II-2	Female	ET	39.5	20.2	MF	Died	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (84%)	<i>IDH2</i> : c.419G>A, p.Arg140Gln	46,XX,der(6)t(6;?) (p25)[7]/46,XX,dup(12)(q13q22)[2]/46,XX[8]
F1	II-3	Female	ET	38	17	PV>MF>AML	Died	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (48%)	<i>IDH2</i> : c.563G>A, p.Arg188Gln <i>TET2</i> : c.1648C>T, p.Arg550*/c.2567delG, p.Gly856fs	46,XX,+1,der(1;7)(q10;p10) [11]/46,XX[5]
F1	II-5	Female	ET	41.2	21.8		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (62%)	<i>IDH1</i> : c.394C>A, p.Arg132Ser <i>IDH2</i> : c.563G>A, p.Arg188Gln	46,XX
F1	II-6	Male	ET	36.8	17		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (2%)	<i>IDH2</i> : c.563G>A, p.Arg188Gln <i>TET2</i> : c.3321dupA, p.Ser1107fs	46,XY[20]
F1	II-7	Male	AML2	43.6	7.9		HSCT, alive	Triple negative	<i>IDH1</i> : c.394C>T, p.Arg132Cys	46,XY,-7,+14[12]/46,XY[11]
F1	III-1	Male	ET	34	8	AML	Died	<i>CALR</i> : c.1099_1150del52 (30%)	<i>TET2</i> : c.2058A>T, p.Arg686Ser	45,XY,-5,der(6)t(6;8)(p22;q21),-17+mar(16)/46,XY[1]
F1	III-4	Male	ET	35.5	8.5		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (2%)	None	NS
F2	II-1	Male	ET	81	0.5	AML	Died	NS	NS	NS
F2	II-2	Female	AML	52	1		Died	NS	NS	NS
F2	II-3	Female	AML	52	ns		Died	NS	NS	NS
F2	III-1	Female	AML2	37.5	0.5		Died	NS	NS	NS
F2	III-2	Female	ET	49	11	PV>MF	Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (49%)	<i>TET2</i> : c.3500+3A>C	46,XY,inv(2)(p24q14)[11]
F2	III-4	Female	aCML	48	0.9	AML	Died	Triple negative	<i>TET2</i> : c.1954delC, p.Gln652fs/c.2490dupA, p.Gln831fs <i>ASXL1</i> : c.2893C>T, p.Arg965*	46,XX,-7[20]
F2	III-7	Male	ET	36	22	AML	HSCT, alive	<i>CALR</i> : c.1099_1150del52 (5%)	None	46,XY,inv(2)(p24q11)c[23]
F2	III-8	Male	CMML	45.5	0.5		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (38%)	<i>TET2</i> : c.4469delA, p.Glu1490fs	46,XY,inv(2)(p25q13)[25]
F2	III-9	Male	ET	41	9	AML	HSCT, died	<i>MPL</i> : p.Trp515Leu (5%)	<i>TET2</i> : c.5551G>T, p.Glu1851*	46,XY,inv(2)(p2?5q1?4)[20]
F2	III-10	Female	ET	34	16	CML, MF	Alive	<i>CALR</i> : c.1099_1150del52 (35%); m-Bcr (e1/a2)	None	46,XX,t(9,22)(q34,q11)[17]
F2	III-11	Female	ET	41.5	6.5		Alive	<i>MPL</i> : p.Trp515Leu (3%)	<i>TET2</i> : c.3804-2A>T	NS
F2	III-13	Female	AML2	35	0.8		HSCT, died	NS	NS	NS
F2	IV-2	Female	ET	33	5		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (1%)	None	46,XY,inv(2)(p24q14)[11]
F2	IV-4	Male	PMF ⁱ	36	0.5		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (72%)	<i>ASXL1</i> : c.1934dupA, p.Gly646fs	46,XY
F2	IV-10	Male	ET	42	0.2		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (14%)	NS	NS
F2	IV-11	Male	AML6	34	1.6		Died	NS	NS	45,XY,-7[18]
F3	II-1	Female	AML5	64.8	0		Died	NS	NS	48,XX,+4,+8[15]
F3	II-2	Female	ET	46.3	22	MF	Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (5%)	<i>TET2</i> : c.3689delT, p.Ile1230fs	46,XX[15]
F3	III-1	Female	ET	42	8		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (1.4%)	None	NS
F3	III-2	Female	ET	34	11		Alive	Triple negative	None	NS
F3	IV-1	Female	ET	29	2		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (11%)	NS	NS
F4	II-1	Male	ET	43.8	0.6		Alive	<i>CALR</i> : c.1099_1150del52 (10%)	None	46,XY[20]
F4	II-2	Female	ET	42	0.2		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (0.6%)	None	NS
F4	II-3	Male	PMF	38.5	0.8		HSCT, alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (61%)	None	46,XY[20]

AML, acute myeloid leukemia (subtype according to French-American-British (FAB) classification); ET, essential thrombocythemia; PV, polycythemia vera; aCML, atypical chronic myeloid leukemia (*BCR-ABL* negative); CMML, chronic myelomonocytic leukemia; PMF, primary myelofibrosis; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; m-Bcr (e1/a2), major breakpoint cluster region rearrangement between exons 1 and 2; NS, not studied. Triple-negative individuals lacked the mutation in *JAK2* encoding p.Val617Phe (c.1849G>T), the mutation in *MPL* encoding p.Trp515Leu (c.1544G>T) and the 52-bp deletion (p.Leu367Thrfs*46) or 5-bp insertion (p.Lys385Asnfs*47) in *CALR*. ID is according to the pedigrees shown in Figure 1.

Expression of the genes contained in the duplication

Using gene expression arrays, we found that three of the six duplicated genes were expressed in Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cell lines (EBVCs) from three donors, namely *TCL1A*, *ATG2B* and *GSKIP*, after normalization to the levels of a housekeeping gene (*PPIA* or *B2M*). However, expression of only *ATG2B* and *GSKIP* was detected on microarrays of CD34⁺ purified hematopoietic progenitors from donors and CD36⁺ erythroblasts or CD41⁺ megakaryocytes derived from CD34⁺ progenitors cultured *in vitro*. Moreover, *ATG2B* and *GSKIP* expression levels were similar to those of *RUNX1* and *STAT5A*, two genes well expressed during normal hematopoiesis (Fig. 4a). Microarrays showed significantly higher levels of *ATG2B* and *GSKIP* transcripts in EBVCs derived from five patients in comparison to EBVCs derived from three control relatives but no difference for *TCL1A* levels (Fig. 4b). We further analyzed the expression of these two genes during normal *in vitro* erythroid and megakaryocyte differentiation from CD34⁺ progenitors. Different cellular fractions were sorted by flow cytometry, and the expression levels of *ATG2B* and *GSKIP* were quantified by qRT-PCR (Fig. 4c,d). *GSKIP* expression did not vary, whereas *ATG2B* expression decreased during megakaryocyte and erythroid differentiation. A strong increase in *ATG2B* expression was observed in terminal erythroid differentiation. We confirmed by qRT-PCR the overexpression (by two- to threefold) of *ATG2B* and *GSKIP* in megakaryocytes derived from patients as compared to controls (Fig. 4e).

Derivation of human induced pluripotent stem cells

To analyze the consequences of the duplication conferring predisposition to MPN, we generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from CD34⁺ progenitor cells sorted from two patients; the patients were selected from the same family to reduce genetic heterogeneity (F2:III-2 (iPSC/P3) and F2:IV-2 (iPSC/P4))¹⁴. Patient F2:III-2, who developed essential thrombocythemia that progressed to myelofibrosis, had a *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe (allele burden in granulocytes, 50%) and a heterozygous *TET2* mutation (c.3500+3A>C) associated with decreased 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) levels (Supplementary Fig. 2). Patient F2:IV-2, who developed essential thrombocythemia with a platelet count slightly above the normal value (450–550 × 10⁹ cells/l), had a *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe with very low allele burden (<1% in granulocytes). We obtained clones bearing only the CNV predisposition locus from patient F2:IV-2 (P4-CNV) and clones harboring the CNV together with one wild-type *JAK2* allele and one allele encoding the p.Val617Phe alteration, with (P3-CNV-VF-TET2) or without (P3-CNV-VF) *TET2* mutation, from patient F2:III-2 (Supplementary Fig. 2). We used as controls previously published iPSC clones obtained by reprogramming CD34⁺ cells from healthy donors or sporadic MPN cases heterozygous for the *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe (P2-VF)¹⁵. All these clones formed embryonic stem cell (ES)-like colonies. We selected two clones of each genotype (a or b), performed genomic characterization using comparative genomic hybridization (CGH) arrays, cytogenetics and

whole-exome sequencing (Supplementary Fig. 3a,b), and validated the phenotype while checking for the silencing of transgenes, the reexpression of endogenous pluripotent transcription factors, and the ability to generate embryoid bodies *in vitro* and to form teratomas *in vivo* (Supplementary Fig. 4a–g).

CNV increases the generation of iPSC-derived hematopoietic cells

To explore the hematopoietic differentiation of iPSC clones, sac-like structures were dissociated at day 12 and cultured on the OP9 stromal cell line in the presence of cytokines¹⁶. First, when hematopoietic progenitor colonies were enumerated 10–12 d after seeding day 13 unfractionated cells in semisolid medium, we observed a tenfold higher number of colonies for samples carrying the CNV predisposition locus alone, regardless of an additional mutation in *JAK2* or *TET2*, in comparison to controls (Fig. 5a). Second, we performed kinetic analyses from day 10 until day 21, and the percentages of megakaryocytes (CD41⁺), erythroblasts (GPA⁺) and monocytes (CD14⁺) were determined as previously described^{15,17,18}. P2-VF iPSC clones (heterozygous for the *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe) did not show marked differences in the expression of hematopoietic markers in comparison to control iPSC clones, whereas all the iPSC clones carrying the CNV predisposition locus had a significantly higher proportion of megakaryocytes as differentiation progressed (Fig. 5b). Increases in the proportions of differentiated cells for clones carrying the CNV alone were further enhanced by the *JAK2* mutation in P3-CNV-VF clones and were even more remarkable, especially for erythroblasts, in P3-CNV-VF-TET2 clones mutated for both *JAK2* and *TET2*. Finally, when iPSCs were sorted for the TRA-1-81 pluripotent surface marker and grown on OP9 cells with a cocktail of cytokines, we observed significantly higher absolute numbers of CD41⁺, CD14⁺ and GPA⁺ cells generated by P4-CNV iPSCs as compared to control iPSCs at day 18 (Fig. 5c).

These results indicate that the CNV predisposition locus could be sufficient to increase the generation of hematopoietic progenitor cells and the overproduction of erythroblasts, megakaryocytes and monocytes, an effect that is reinforced by additional mutations in *JAK2* and/or *TET2*.

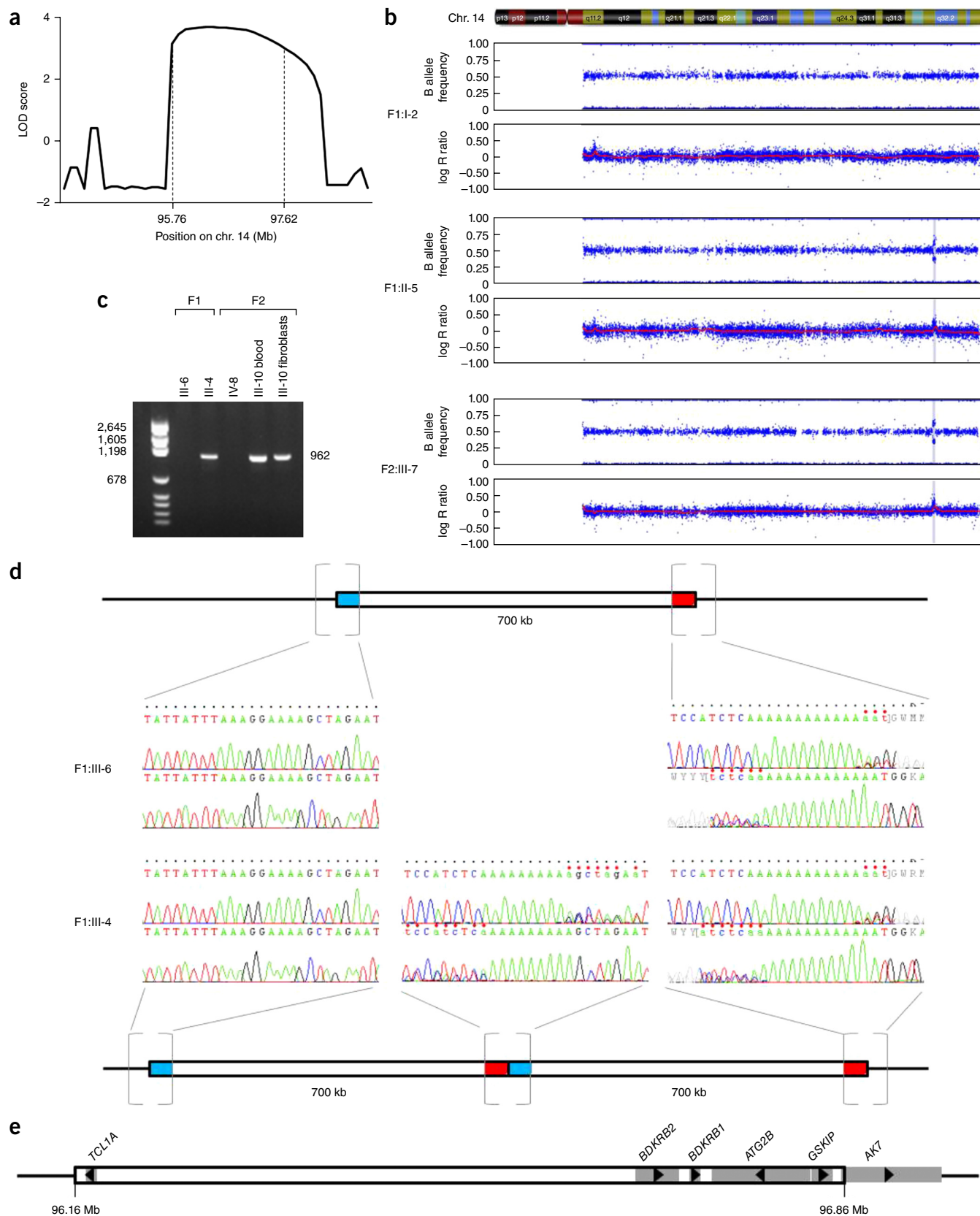
CNV and the response of progenitors to cytokines

Because hypersensitivity of hematopoietic progenitors to cytokines is a characteristic feature of MPN¹⁹, we cultured iPSC clones on OP9 stromal cells for 12 d in the presence of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hematopoietic cytokines and then sorted for the hematopoietic progenitor cell fraction (GPA⁺CD41⁺). These cells were grown for 12 d in methylcellulose in the presence of stem cell factor (SCF) and increasing concentrations of erythropoietin (EPO). The response to EPO was equivalent for control, P2-VF and P4-CNV progenitor cells. In contrast, P3-CNV-VF and P3-CNV-VF-TET2 progenitor cells demonstrated increased sensitivity to EPO, with around 30% of the colonies formed constituting endogenous erythroid colonies (EECs) (Supplementary Fig. 5a). Moreover, the

Figure 2 Characterization of the germline CNV. (a) Positive linkage signal (z score = 3.7) at 14q32. The dashed lines highlight the linkage signal in the two initial families (F1 and F2). (b) SNP array analysis showing a 700-kb duplication in both families F1 and F2. A chromosome 14 ideogram is shown at the top. For each individual, the lower plot shows the log R ratio (y axis) for 9,592 probes on chromosome 14 (x axis) and the upper plot shows the B allele frequency (y axis) for each probe position (x axis). The array profiles for F1:II-5 and F2:III-7 show 3 copies of the genomic region chr. 14: 95.76–97.62 Mb, with an increased log R ratio of ~0.4 and B allele frequencies with values at 0 for the AAA genotype, 0.33 for the AAB genotype, 0.67 for the ABB genotype and 1 for the BBB genotype. The array profile for F1:I-2 (a control) shows only 2 copies for this segment with a normal log R ratio and B allele frequencies with values at 0 for the AA genotype, 0.5 for the AB genotype and 1 for the BB genotype. (c) Gel electrophoresis showing the amplification of a 962-bp junction fragment in patients (F1:III-4 and F2:III-10) and its absence in non-carrier controls (F1:III-6 and F2:IV-8). Analysis of DNA extracted from blood and fibroblasts (F2:III-10) showed the germline status of the identified CNV. The primers used for PCR were Chr14_B2-C2.1F and Chr14_B1-C2.3R (Supplementary Table 2). (d) Mapping and sequencing of the proximal and distal breakpoints established the duplication as a 700-kb head-to-tail tandem duplication. (e) Schematic structural organization of the duplicated region including six genes. Arrowheads indicate the direction of transcription.

percentage of large primitive erythroblast colonies was higher for P3-CNV-VF-TET2 progenitor cells as compared to P3-CNV-VF and control progenitor cells (Supplementary Fig. 5b,c).

JAK2 is a key molecule in the cytokine receptor signaling cascade, and JAK2 Val617Phe induces constitutive activation of downstream signaling pathways in cell lines and primary cells²⁰. iPSC-derived



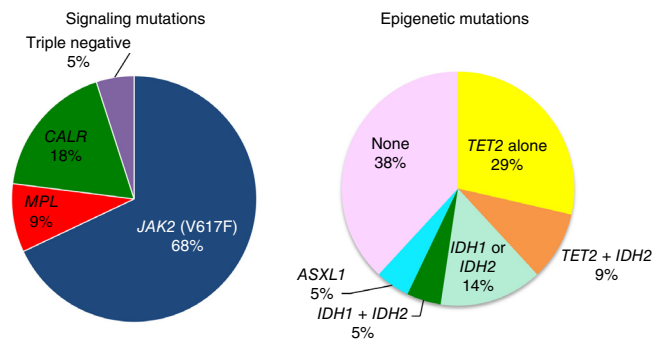


Figure 3 Pie chart representation of acquired signaling and epigenetic mutations in MPN from the four families.

erythroblasts were expanded in liquid culture in the presence of EPO and SCF from day 12 to day 18 and then deprived of cytokines. Constitutive STAT5, ERK and AKT phosphorylation was observed only in P3-CNV-VF and P3-CNV-VF-TET2 cells (**Supplementary Fig. 5d**), confirming their EPO-independent growth. This effect was not observed in either P2-VF cells, bearing only a heterozygous *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe, or P4-CNV cells. EPO induced the phosphorylation of STAT5, ERK and AKT in all erythroblast cultures, whatever their genotype. These results argue for a synergistic effect of the CNV and the *JAK2* and *TET2* mutations on erythroid progenitor sensitivity to EPO.

We subsequently explored the TPO sensitivity of megakaryocyte progenitors. Day 12 GPA^+CD41^+ progenitors were sorted and grown for 12 d in serum-free fibrin clots in the presence or absence of increasing TPO concentrations. Rare TPO-independent megakaryocyte colonies, around 10% of the maximum number for TPO-stimulated cultures, were obtained for megakaryocyte progenitors generated from control iPSCs in contrast to the 50% of maximum TPO-stimulated colonies obtained for TPO-independent megakaryocyte colonies generated from iPSCs heterozygous for the *JAK2* mutation, as described¹⁵ (**Supplementary Fig. 5e**). Interestingly, the predisposition locus alone (P4-CNV) caused a similar induction in the formation of TPO-independent megakaryocytes (resulting in around 40% of the maximum colony numbers for TPO-stimulated

cells), an effect that was further enhanced by the *JAK2* mutation (P3-CNV-VF), whereas *TET2* mutation (P3-CNV-VF-TET2) did not further modify the response to TPO. Finally, when GPA^+CD41^+ progenitors were cultured in the presence of SCF and TPO, the megakaryocytes derived from all iPSCs harboring the predisposition locus showed enrichment for hyperploid megakaryocyte cells (**Supplementary Fig. 5f,g**).

To validate these observations, we went back to $CD34^+$ hematopoietic progenitors from patients, including F2:III-6 (CNV alone), F2:IV-2 (CNV and a low burden of *JAK2* mutation (p.Val617Phe)), F2:III-2 (CNV and *JAK2* (p.Val617Phe) and *TET2* mutation) and F1:II-1 (CNV and *JAK2* (p.Val617Phe) and *IDH1* mutation), and explored their ability to form EECs and endogenous CFU-MKs. We observed that the CNV alone promoted the spontaneous generation of colony forming unit-megakaryocytes (CFU-MKs) and that this effect was reinforced by *JAK2* mutation (**Fig. 6a**). We also detected a tiny amount of spontaneous EEC formation with the CNV alone that was further enhanced by the *JAK2* mutation in patients F2:IV-2 and F1:II-1 (**Fig. 6b**). The *TET2* mutation, in contrast to the *IDH1* mutation, did not have an additive effect on this response but instead affected the size of the colonies and, thus, the proliferation rate of the erythroblasts (F2:III-6 versus F2:III-2; **Fig. 6c**). Taken together, the results suggest that the CNV predisposition locus promotes megakaryopoiesis by inducing the spontaneous generation of CFU-MKs and the formation of hyperploid megakaryocytes. The CNV predisposition locus also seems to cooperate with the *JAK2* mutation to modify the response of hematopoietic progenitors to EPO.

Characterization of genes involved in the phenotype

To investigate the function of *ATG2B* and *GSKIP* in hematopoiesis, we transduced $CD34^+$ progenitor cells from controls with a lentivirus expressing either short hairpin RNA (shRNA) targeting these genes or a scrambled sequence, with GFP as a selection marker. The shRNAs to *ATG2B* and *GSKIP*, alone or in combination, resulted in about a 40–50% reduction in the transcript levels of their respective targets (**Fig. 7a**). We explored the effect of these shRNAs on megakaryocyte progenitors and found a significant decrease in the frequency of CFU-MKs with each shRNA alone or with the shRNAs used in combination. In addition, the simultaneous silencing of both *ATG2B*

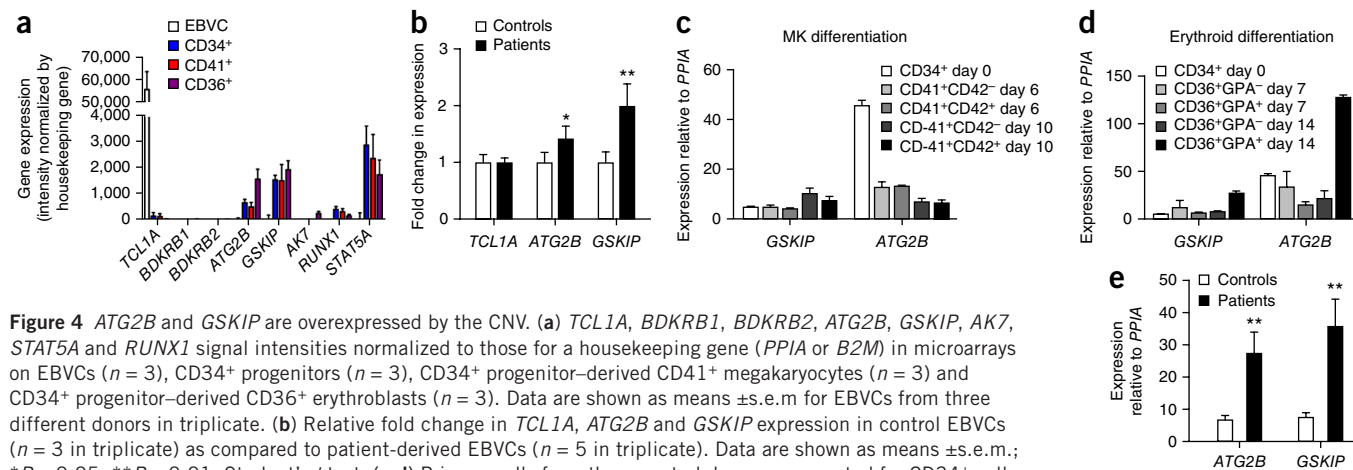
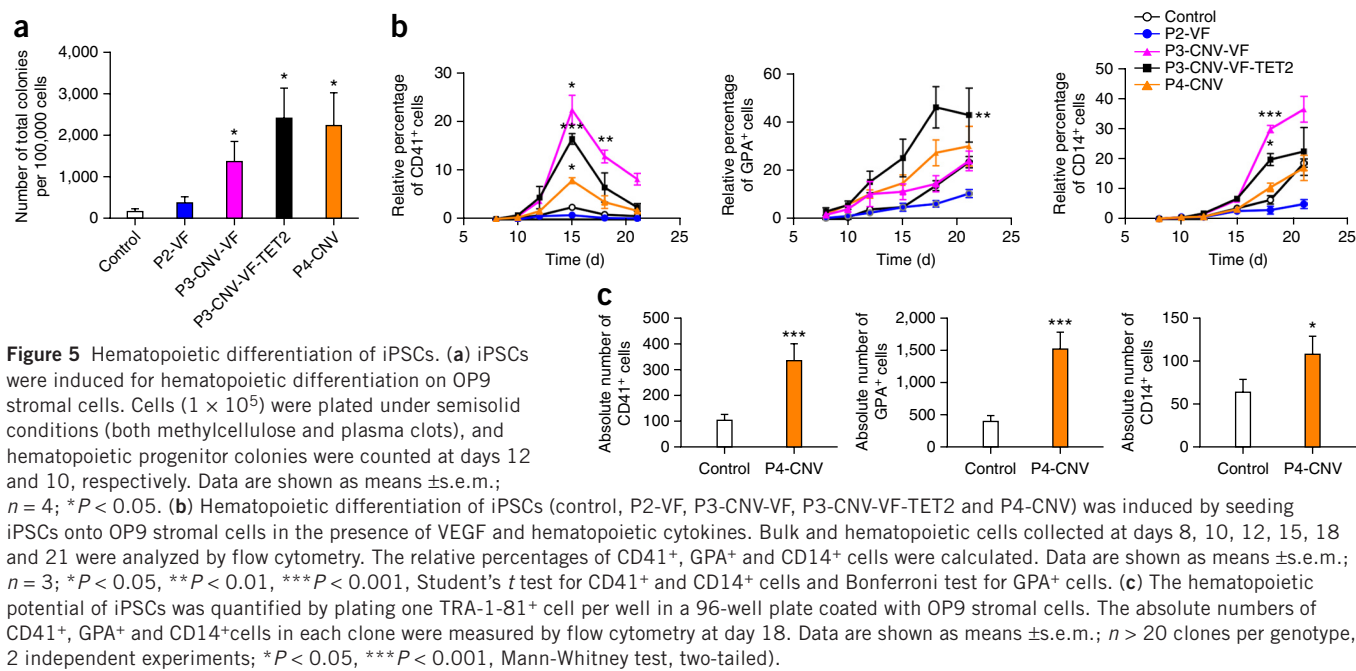


Figure 4 *ATG2B* and *GSKIP* are overexpressed by the CNV. **(a)** *TCL1A*, *BDKRB1*, *BDKRB2*, *ATG2B*, *GSKIP*, *AKT*, *STAT5A* and *RUNX1* signal intensities normalized to those for a housekeeping gene (*PPIA* or *B2M*) in microarrays on EBVCs ($n = 3$), $CD34^+$ progenitors ($n = 3$), $CD34^+$ progenitor-derived $CD41^+$ megakaryocytes ($n = 3$) and $CD34^+$ progenitor-derived $CD36^+$ erythroblasts ($n = 3$). Data are shown as means \pm s.e.m. for EBVCs from three different donors in triplicate. **(b)** Relative fold change in *TCL1A*, *ATG2B* and *GSKIP* expression in control EBVCs ($n = 3$ in triplicate) as compared to patient-derived EBVCs ($n = 5$ in triplicate). Data are shown as means \pm s.e.m.; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, Student's *t* test. **(c,d)** Primary cells from three control donors were sorted for $CD34^+$ cells, grown with SCF (25 ng/ml) and TPO (20 ng/ml) **(c)** or with SCF (25 ng/ml), interleukin (IL)-3 (10 μ g/ml) and EPO (1 U/ml) **(d)**, and sorted at day 6 or 10 for megakaryocyte (MK) differentiation **(c)** or at day 7 or 14 for erythroid differentiation **(d)**. *ATG2B* and *GSKIP* levels were quantified by qRT-PCR in each fraction. Expression relative to that of *PPIA* was calculated. Data are shown as means \pm s.e.m. **(e)** *ATG2B* and *GSKIP* expression was quantified by qRT-PCR in $CD41^+CD42^+$ cells derived from three controls and three patients at day 10 of megakaryocyte differentiation. Data are shown as means \pm s.e.m.; $**P < 0.01$, Student's *t* test.



and *GSKIP* led to a further decrease in CFU-MK size beyond that resulting from silencing with the shRNAs individually (Fig. 7b,c).

To investigate the role of these genes in the phenotypic consequences of the genomic duplication, the shRNAs were virally transduced, alone or in combination, into CD41⁺GPA⁺ megakaryocyte progenitors generated from P4-CNV iPSCs at day 12, and the progenitors were grown for 12 additional days in serum-free fibrin clots in the presence or absence of TPO (Fig. 7d). *ATG2B* and *GSKIP* shRNA alone had no impact on spontaneous CFU-MK formation, but the combination of these shRNAs resulted in a major inhibition of TPO-independent CFU-MK formation (Fig. 7e). The role of *ATG2B* and *GSKIP* in the spontaneous generation of megakaryocytes was further confirmed by virally transducing both shRNAs into CD34⁺ hematopoietic progenitor cells from patients (Fig. 7f,g). Conversely, we failed to detect any effect of *TCL1A* downregulation by shRNA under the same conditions, and overexpression of *TCL1A* in CD34⁺ progenitors did not result in the spontaneous generation of megakaryocytes (data not shown). Altogether, our findings indicate that both *ATG2B* and *GSKIP* are responsible for the megakaryocyte phenotype induced by the CNV predisposition locus.

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis of the genes differentially expressed by control- and patient-derived EBVCs identified eight significantly different gene sets and points to abnormal

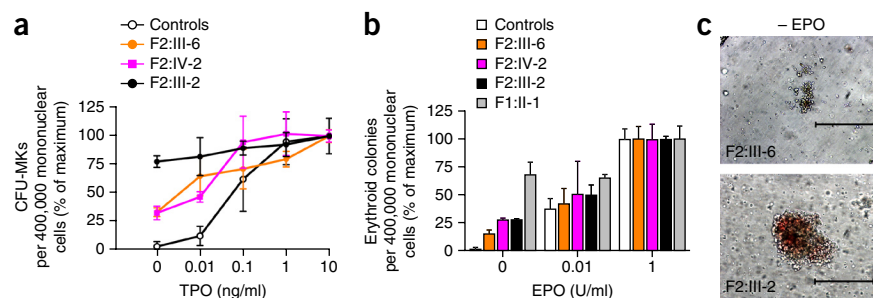
functioning of the endoplasmic reticulum with deregulated chaperoning and glycosylation (Supplementary Table 4). Transcriptome analysis showed a significant ($P < 0.001$) increase in the expression of *WIPI1* (*ATG18*), which encodes a protein that interacts with *ATG2B*, in patients with MPN. Moreover, autophagosome accumulation was found in platelets from patients or asymptomatic carriers, as shown by an increase in the levels of the autophagosome marker LC3-II, a phosphatidylethanolamine-conjugated form of LC3-I (Supplementary Fig. 6a,b).

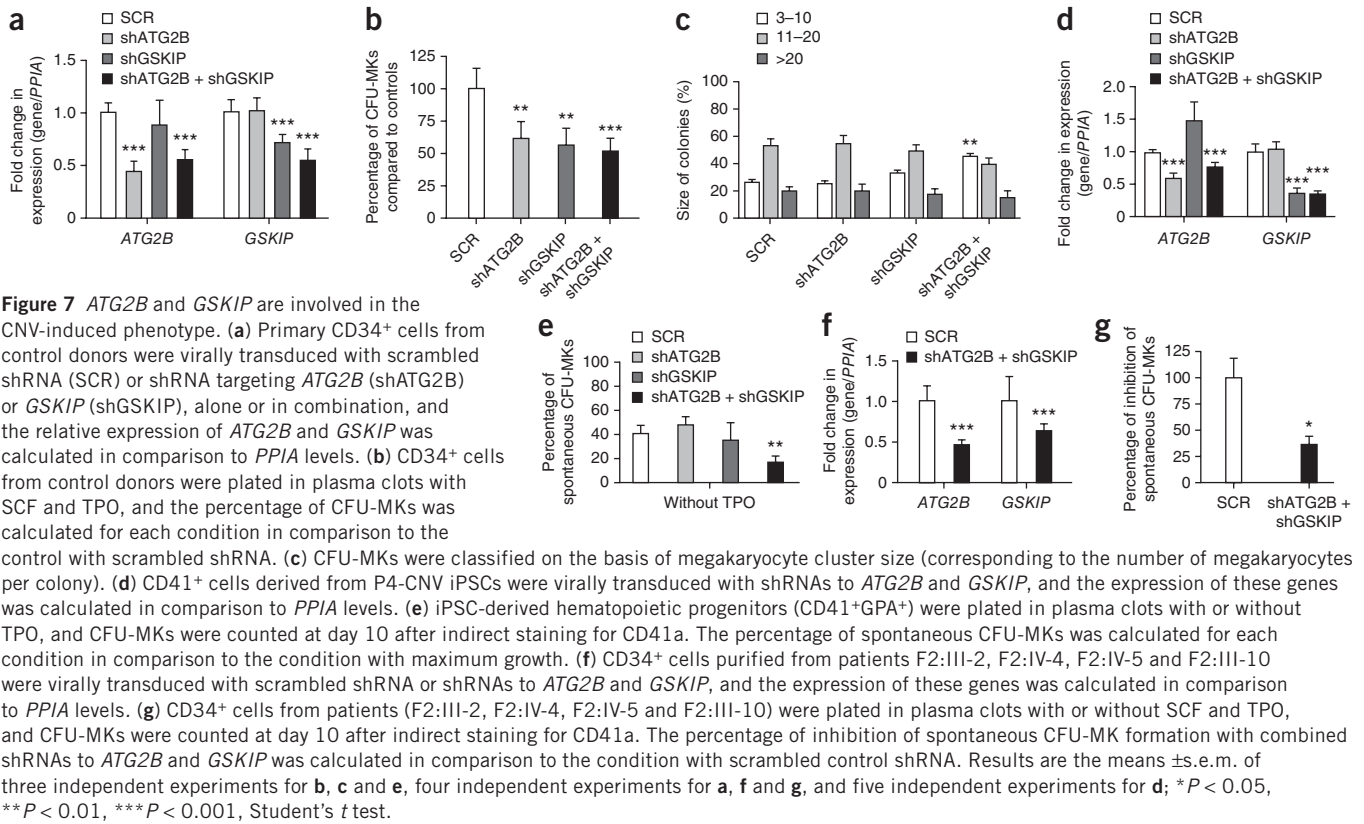
DISCUSSION

We identified a 700-kb germline duplication that predisposes patients to myeloid malignancies, including AML, MPN, CMML and frequent essential thrombocythemia with progression to myelofibrosis and secondary AML. Two of the six duplicated genes, namely *ATG2B* and *GSKIP*, are overexpressed in hematopoietic progenitors. In turn, megakaryocyte progenitors demonstrate increased sensitivity to TPO. The overexpression of these genes cooperates with classical mutations in *JAK2*, *MPL* and *CALR* to generate the MPN phenotype. This germline duplication is, to our knowledge, the first identified genomic alteration that accounts for familial MPN.

Some susceptibility alleles, such as the one in the *JAK2* 46/1 haplotype, an intronic SNP in the *TERT* gene⁹⁻¹³ and variants in the

Figure 6 The CNV predisposition locus modifies the sensitivity to EPO and TPO in primary cells from patients. (a–c) Primary CD34⁺ cells from three control donors and four patients (F2:III-6, F2:IV-2, F2:III-2 and F1:II-1) were grown with SCF (25 ng/ml) in the presence or absence of various doses of TPO (a) or were grown with SCF (25 ng/ml) and IL-3 (10 μ g/ml) in the presence or absence of various doses of EPO (b,c) and then grown under semisolid conditions either in plasma clots (a) or methylcellulose (b,c). The percentage of CFU-MKs (a) or erythroid colonies (b) was calculated in comparison to the condition with maximum growth (with either 10 ng/ml TPO or 1 U/ml EPO, respectively). Results are shown as means \pm s.d. (c) Images represent EECs (obtained without EPO). Scale bars, 200 μ m.





ERCC2, *ATM*, *CCDC6* and *NR3C1* (*GR*) genes, are diversely present in the general population and favor the development or evolution of sporadic cases of MPN^{21,22}. However, they appear to have limited roles in familial MPN. CNVs, involving either deletion or amplification, have been frequently related to cancer predisposition^{23,24}. The 700-kb germline duplicated region identified here, which segregates among the 24 affected family members of the 4 families, is associated with a high penetrance level, above 80%. The predisposition locus is located in the 14q32.2 region, which is rarely affected by recurrent cytogenetic aberrations in chronic and acute phases of MPN evolution^{25–27}, although trisomy 14 has been associated with myeloid malignancies that develop in older individuals^{28,29}, in MDS, atypical chronic myeloid leukemia (aCML) and CMM1^{30,31}. Interestingly, one patient (F1:II-7) who directly developed an acute leukemia demonstrated mosaic trisomy 14 with up to five copies of the CNV, arguing for a gene dosage effect.

Our familial MPN cases were characterized by an earlier age of MPN onset in comparison to sporadic cases (41 years versus >60 years). Notably, the spectrum of acquired driver mutations leading to essential thrombocythemia included *JAK2* (p.Val617Phe), *MPL* and *CALR* mutations, with some cases triple negative for these mutations, similar to the spectrum of mutations in sporadic essential thrombocythemia cases^{32,33}. Additional genetic events were detected in this setting, including the combination of a *BCR-ABL* fusion gene³⁴ and epigenetic regulator gene mutations affecting *TET2*, *IDH1*, *IDH2* and *ASXL1*, when the MPN progressed. The percentage of cases with *TET2* mutations (38%) was very high when compared to that described for cases of sporadic essential thrombocythemia and other familial clusters of MPN (10–15%)^{7,35}. The detection of *TET2* mutations (including biallelic mutations) and *IDH1* and *IDH2* mutations was frequently associated with disease progression to acute leukemia, in agreement with some observations suggesting that, in MPN, the acquisition of

a *TET2* mutation is predictive of a poor outcome and a high risk of transformation into leukemia^{7,36,37}. No mutation of *TP53* was found in our cases, contrary to what was observed in AML evolving from MPN, suggesting two different pathways for leukemic transformation.

A well-studied chromosomal duplication that predisposes to acute leukemia is the trisomy 21 responsible for Down syndrome. Trisomy 21 predisposes to the acquisition of *GATA1* mutations resulting in a short form of the transcription factor, which induces a transient myeloproliferative disorder. In about 25% of cases, this transient proliferation evolves into megakaryoblastic leukemia through the acquisition of secondary mutations that target cohesin components, epigenetic modulators and signaling pathways, including *JAK2* and *MPL* mutations³⁸. There is evidence that trisomy 21, by increasing the proliferation of erythroid and megakaryocyte progenitors in fetal liver, predisposes to leukemia. This effect has been modeled in iPSCs, as mouse models of trisomy 21 failed to fully recapitulate the disease predisposition^{39,40}. We also established iPSC clones to explore the consequences of the gene duplication, alone or in combination with acquired mutations, on hematopoiesis, showing that the CNV (i) promotes the amplification of hematopoietic progenitors, including megakaryocytes, through increasing their sensitivity to TPO; (ii) consequently induces an increase in the size and ploidy of mature CD41⁺ megakaryocytes; (iii) cooperates with *JAK2* (p.Val617Phe) mutation to increase the sensitivity of erythroid progenitors to EPO and promote constitutive activation of signaling pathways; and (iv) synergizes with *TET2* and *JAK2* (p.Val617Phe) mutations to promote erythroid cell proliferation and amplification. The hypersensitivity of hematopoietic precursors carrying the CNV to EPO and TPO was further confirmed in primary cells collected from patients. As with trisomy 21, the identified germline duplication did not result in overt genetic instability but rather increased the fitness of the *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe by acting synergistically with it.

In agreement with this, we observed a similar occurrence of higher numbers of mutations (around 10–15) during iPSC reprogramming in cells derived from patients in comparison to control cells from normal donors⁴¹. Moreover, recent data show that the *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe is quite frequent in the general aging population^{42–45}, suggesting that it rarely induces MPN development, as demonstrated in mice engrafted with a single hematopoietic stem cell (HSC) expressing Jak2 Val617Phe⁴⁶. Therefore, the duplication could provide a favorable genetic background to facilitate the clonal dominance of a cell expressing *JAK2* Val617Phe (**Supplementary Fig. 7**). In support of this hypothesis, (i) the duplication enhances the fitness of mutations but does not directly cause a mutant phenotype and (ii) the spectrum and distribution of signaling mutations in these families are similar to those of sporadic MPN cases.

Of the six duplicated genes in the CNV region, only the expression of *ATG2B* and *GSKIP* was reproducibly detected in hematopoietic cells, including CD34⁺ hematopoietic progenitors, megakaryocytes and erythroid cells. *TCL1A*, whose expression was first described in mature T cell leukemia, was not expressed in CD34⁺ cells or myeloid cells, nor was it overexpressed in patient-derived EBVCs. Strikingly, *ATG2B* cooperated with *GSKIP* to induce the spontaneous formation of CFU-MKs from patient-derived cells and iPSC-derived hematopoietic cells, and silencing of *ATG2B* and *GSKIP* reversed this phenotype. Loss-of-function mutations in *ATG2B*, which encodes an important player in autophagy⁴⁷, have been identified in gastric and colorectal cancers⁴⁸, and deregulated autophagy could affect HSC self-renewal capabilities, for example, in aging subjects^{49,50}. Accordingly, we found increased autophagosome accumulation in platelets from patients and asymptomatic carriers of the CNV. The *GSKIP* gene encodes a negative regulator of GSK3 β (refs. 51,52), and its mutation may thus mimic activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway involved in HSC homeostasis and normal megakaryopoiesis^{53,54}, as well as transformation in chronic myeloid leukemia and the development of leukemia stem cells in AML^{55,56}. Accordingly, the overexpression of these two genes may account for the progression of essential thrombocythemia to myelofibrosis and AML observed in the families studied here. Complementary studies will explore how *ATG2B* and *GSKIP* overexpression cooperates with *JAK2* (p.Val617Phe) mutation to provide a growth advantage to HSCs. It may also be useful to determine whether *ATG2B* or *GSKIP* amplification is a frequent event in a large cohort of patients with sporadic MPN.

In summary, analysis of four families with the same geographical origin identifies a locus whose duplication promotes the occurrence of severe MPN through overexpression of *ATG2B* and *GSKIP*, resulting in increased fitness for cells bearing somatic mutations such as mutations in *JAK2*, *MPL* and *CALR*. Together with the recent observation that these mutations are frequent in otherwise healthy aging individuals, these results pave the way for the search for other genetic events that promote the expansion of mutated cells and the generation of overt MPNs, with or without progression to myelofibrosis and AML.

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

Accession codes. The microarray data have been submitted to the ArrayExpress data repository at the European Bioinformatics Institute under accession [E-MTAB-3570](#). CGH array data are available at the Gene Expression Omnibus (GEO) under accession [GSE67938](#).

The CNVs found in patients were deposited in ClinVar under accessions [SCV000223992](#), [SCV000224007](#), [SCV000224008](#), [SCV000224009](#) and [SCV000224010](#).

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly thank all the patients and family members involved in the study. We also thank O. Bawa and P. Opolon for the histopathological analysis of teratomas. We thank B. Benyahia for cytogenetic analysis. We thank M. Vestris for recruitment of patients. We greatly thank B. Job and the genomic platform for transcriptome and CGH analysis and also the iPSC platform of Institut Gustave Roussy. We thank S. Saker and T. Larmonier from the Généthon DNA and Cell Bank (Evry, France) for the establishment of B-lymphoblastoid cells from ‘NMP’ patients. We thank the cytometry platform of Institut Gustave Roussy (P. Rameau and Y. Lecluse). We thank C. Marzac for clinical data. We are grateful to S. Constantinescu and J. Feunteun for critical reading of the manuscript. We are also very grateful to E. Schwartz for proofreading the manuscript.

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR) (Blanc Megon 2009, Thrombocytosis 2011; ANR-13-JVSV1-GERMPN-01), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (Fondation ARC Libre 2012-SL220120605292), Groupe Information Santé (GIS)–Institute for Rare Diseases for High-Throughput Sequencing (AO9102LS), Association de Recherche sur la Moelle Osseuse (ARMO), regional Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) AOR07014, Association Laurette Fugain and INCa-DGOS-INSERM 6043. Labex GR-Ex (I.P. and W.V.) is funded by the program ‘Investissements d’Avenir’. G. Lenglet was supported by a postdoctoral fellowship from Ile-de-France Canc rop le and ANR Molecular Medicine in Oncology (MMO) (funded by the program ‘Investissements d’Avenir’). F.P. was supported by ARC. L.S. and J.S. were supported by doctoral grants from the Ile-de-France region (Canc rop le and DIM Cellule Souche) and from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). C.M. was supported by ANR-13-JVSV1-GERMPN-01.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

W.V., I.P. and C.B.-C. designed and performed research, analyzed data, prepared figures and wrote the manuscript. J.S. performed research on iPSCs and primary cells. G. Lenglet, A.D.S. and L.S. performed research on iPSCs. C.S.-M., N. Droin and G. Leroy performed pangenomic analysis. C.M. performed immunoblot and qRT-PCR analyses. A.P. purified primary cells from donors. E.M. performed colony assays. F.P., J.-C.M., C.D.-D., P.F., F.I. and N.C. were involved in the clinical aspect of the study. A.N. was involved in the clinical aspect of the study and initiated the familial study of MPN. S.G. and S.C. were involved in the generation of EBVCs and their study. B.K. performed cytogenetic analysis. M’b.D., J.M. and P.D. carried out bioinformatics study of exome and transcriptomic data. N. Debili and H.R. provided experimental and/or intellectual input on iPSC culture and hematopoietic differentiation. V.D.V. performed TCL1 mouse modeling. E.S. and O.A.B. contributed intellectual input. All authors contributed to writing and editing.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Song, W.J. *et al.* Haploinsufficiency of *CBFA2* causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat. Genet.* **23**, 166–175 (1999).
2. Smith, M.L., Cavenagh, J.D., Lister, T.A. & Fitzgibbon, J. Mutation of *CEBPA* in familial acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2403–2407 (2004).
3. Hahn, C.N. *et al.* Heritable *GATA2* mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* **43**, 1012–1017 (2011).
4. Pasquet, M. *et al.* High frequency of *GATA2* mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 822–829 (2013).
5. Bluteau, D. *et al.* Thrombocytopenia-associated mutations in the *ANKRD26* regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J. Clin. Invest.* **124**, 580–591 (2014).
6. Bellanné-Chantelot, C. *et al.* Genetic and clinical implications of the Val617Phe *JAK2* mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* **108**, 346–352 (2006).
7. Saint-Martin, C. *et al.* Analysis of the ten-eleven translocation 2 (*TET2*) gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood* **114**, 1628–1632 (2009).

8. Yamada, O. *et al.* Emergence of a *BCR-ABL* translocation in a patient with the *JAK2V617F* mutation: evidence for secondary acquisition of *BCR-ABL* in the *JAK2V617F* clone. *J. Clin. Oncol.* **32**, e76–e79 (2014).
9. Jones, A.V. *et al.* *JAK2* haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* **41**, 446–449 (2009).
10. Kilpivaara, O. *et al.* A germline *JAK2* SNP is associated with predisposition to the development of *JAK2V617F*-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* **41**, 455–459 (2009).
11. Olcaydu, D. *et al.* A common *JAK2* haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* **41**, 450–454 (2009).
12. Jäger, R. *et al.* Common germline variation at the *TERT* locus contributes to familial clustering of myeloproliferative neoplasms. *Am. J. Hematol.* **89**, 1107–1110 (2014).
13. Oddsson, A. *et al.* The germline sequence variant rs2736100_C in *TERT* associates with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **28**, 1371–1374 (2014).
14. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
15. Saliba, J. *et al.* Heterozygous and homozygous *JAK2V617F* states modeled by induced pluripotent stem cells from myeloproliferative neoplasm patients. *PLoS ONE* **8**, e74257 (2013).
16. Takayama, N. *et al.* Generation of functional platelets from human embryonic stem cells *in vitro* via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* **111**, 5298–5306 (2008).
17. Klimchenko, O. *et al.* A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood* **114**, 1506–1517 (2009).
18. Vodyanik, M.A., Bork, J.A., Thomson, J.A. & Slukvin, I.I. Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* **105**, 617–626 (2005).
19. Prchal, J.F. & Axelrad, A.A. Letter: bone-marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382 (1974).
20. James, C. *et al.* A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144–1148 (2005).
21. Jones, A.V. & Cross, N.C. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther. Adv. Hematol.* **4**, 237–253 (2013).
22. Harutyunyan, A.S. & Kralovics, R. Role of germline genetic factors in MPN pathogenesis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **26**, 1037–1051 (2012).
23. Krepischi, A.C., Pearson, P.L. & Rosenberg, C. Germline copy number variations and cancer predisposition. *Future Oncol.* **8**, 441–450 (2012).
24. Kuiper, R.P., Ligtenberg, M.J., Hoogerbrugge, N. & Geurts van Kessel, A. Germline copy number variation and cancer risk. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 282–289 (2010).
25. Klampfl, T. *et al.* Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood* **118**, 167–176 (2011).
26. Rice, K.L. *et al.* Analysis of genomic aberrations and gene expression profiling identifies novel lesions and pathways in myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J.* **1**, e40 (2011).
27. Rumi, E. *et al.* Identification of genomic aberrations associated with disease transformation by means of high-resolution SNP array analysis in patients with myeloproliferative neoplasm. *Am. J. Hematol.* **86**, 974–979 (2011).
28. Cui, W. *et al.* Trisomy 14 as a sole chromosome abnormality is associated with older age, a heterogeneous group of myeloid neoplasms with dysplasia, and a wide spectrum of disease progression. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 365318 (2010).
29. Mancini, M. *et al.* Trisomy 14 in hematologic diseases. Another non-random abnormality within myeloid proliferative disorders. *Cancer Genet. Cytogenet.* **66**, 39–42 (1993).
30. Mertens, F. *et al.* Trisomy 14 in atypical chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **4**, 117–120 (1990).
31. Toze, C.L., Barnett, M.J., Naiman, S.C. & Horsman, D.E. Trisomy 14 is a non-random karyotypic abnormality associated with myeloid malignancies. *Br. J. Haematol.* **98**, 177–185 (1997).
32. Bellanne-Chantelot, C., Jegou, P., Lionne-Huyghe, P., Tulliez, M. & Najman, A. The *JAK2V617F* mutation may be present several years before the occurrence of overt myeloproliferative disorders. *Leukemia* **22**, 450–451 (2008).
33. Rumi, E. *et al.* *CALR* exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood* **123**, 2416–2419 (2014).
34. Cabagnols, X., Cayuela, J.M. & Vainchenker, W. A *CALR* mutation preceding *BCR-ABL1* in an atypical myeloproliferative neoplasm. *N. Engl. J. Med.* **372**, 688–690 (2015).
35. Delhommeau, F. *et al.* Mutation in *TET2* in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2289–2301 (2009).
36. Abdel-Wahab, O. *et al.* Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res.* **70**, 447–452 (2010).
37. Lundberg, P. *et al.* Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **123**, 2220–2228 (2014).
38. Yoshida, K. *et al.* The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat. Genet.* **45**, 1293–1299 (2013).
39. Chou, S.T. *et al.* Trisomy 21-associated defects in human primitive hematopoiesis revealed through induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 17573–17578 (2012).
40. Maclean, G.A. *et al.* Altered hematopoiesis in trisomy 21 as revealed through *in vitro* differentiation of isogenic human pluripotent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 17567–17572 (2012).
41. Gore, A. *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 63–67 (2011).
42. Genovese, G. *et al.* Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2477–2487 (2014).
43. Jaiswal, S. *et al.* Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2488–2498 (2014).
44. McKeirrell, T. *et al.* Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep.* **10**, 1239–1245 (2015).
45. Xie, M. *et al.* Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat. Med.* **20**, 1472–1478 (2014).
46. Lundberg, P. *et al.* Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing *JAK2-V617F*. *J. Exp. Med.* **211**, 2213–2230 (2014).
47. Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Itakura, E. & Mizushima, N. Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J. Cell Sci.* **127**, 4089–4102 (2014).
48. Kang, M.R. *et al.* Frameshift mutations of autophagy-related genes *ATG2B*, *ATG5*, *ATG9B* and *ATG12* in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J. Pathol.* **217**, 702–706 (2009).
49. Mortensen, M., Watson, A.S. & Simon, A.K. Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. *Autophagy* **7**, 1069–1070 (2011).
50. Warr, M.R. *et al.* FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* **494**, 323–327 (2013).
51. Chou, H.Y. *et al.* GSKIP is homologous to the Axin GSK3(interaction domain and functions as a negative regulator of GSK3β. *Biochemistry* **45**, 11379–11389 (2006).
52. Lin, C.C. *et al.* GSKIP, an inhibitor of GSK3β, mediates the N-cadherin/β-catenin pool in the differentiation of SH-SY5Y cells. *J. Cell. Biochem.* **108**, 1325–1336 (2009).
53. Li, D., August, S. & Woulfe, D.S. GSK3β is a negative regulator of platelet function and thrombosis. *Blood* **111**, 3522–3530 (2008).
54. Soda, M., Willert, K., Kaushansky, K. & Geddis, A.E. Inhibition of GSK-3β promotes survival and proliferation of megakaryocytic cells through a β-catenin-independent pathway. *Cell. Signal.* **20**, 2317–2323 (2008).
55. Abrahamsson, A.E. *et al.* Glycogen synthase kinase 3β missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 3925–3929 (2009).
56. Wang, Y. *et al.* The Wnt/β-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science* **327**, 1650–1653 (2010).

ONLINE METHODS

Patients. All participants in this study gave their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the local research ethics committee from Saint-Antoine Hospital (Paris, France). MPN was defined according to World Health Organization (WHO) criteria for essential thrombocythemia and myelofibrosis⁵⁷. Clinical features and hematological parameters were collected at diagnosis and during the course of the disease and recorded in an Access database approved by the French computer commission (CNIL 815419).

We studied 4 families originating from the West Indies and analyzed as controls 98 unrelated familial cases collected through a national network previously described as controls^{6,58}. We also used geographically matched DNA controls from 39 sporadic MPN cases recruited from the Department of Hematology (Fort de France Hospital) and 199 healthy controls of West Indies origin collected by the Department of Genetics (Pitié-Salpêtrière Hospital).

iPSC generation and culture. CD34⁺ and CD3⁺ cells were purified from blood mononuclear cells. CD34⁺CD38⁻ and CD34⁺CD38⁺ cells were cultured in serum-free medium with cytokines for 5 d before being infected with VSV-G pseudotyped retroviruses encoding *Oct4*, *Myc*, *Klf4* and *Sox2* (ref. 14). Six days later, cells were seeded on irradiated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in ES medium⁵⁹. Colonies with an ES-like morphology were picked from day 20 to day 30 and expanded. Cells were routinely screened for mycoplasma using the Plasma Test kit (Invivogen).

Hematopoietic differentiation was performed on OP9 stromal cells in the presence of VEGF (20 ng/ml; Peprotech)¹⁶. The mouse OP9 cell line was from the RIKEN Institute, Osaka University. On day 7, EPO (1 U/ml; Amgen), TPO (20 ng/ml; a generous gift from Kirin), SCF (25 ng/ml; Biovitrum AB) and IL-3 (10 ng/ml; Miltenyi Biotec) were added, and on days 11 and 12 cells were enzymatically dissociated. The recovered cells were cultured or sorted on the basis of the expression of GPA and CD41. Clonal differentiation of iPSCs was also performed on OP9 cells.

Quantification of clonogenic progenitors in semisolid culture. Cells were plated either in methylcellulose to quantify erythroid and granulomonocytic (CFU-GM) progenitors or in serum-free fibrin clot assays to quantify CFU-MKs⁶⁰. Cultures were scored after 12–14 d for all colonies¹⁷. CFU-MKs were enumerated at day 10 after labeling by an indirect alkaline phosphatase-based immunostaining technique using a monoclonal antibody to CD41a (Becton Dickinson, clone HIP8), as previously described⁶⁰.

Teratoma assays and embryoid bodies. iPSCs (1×10^6) were scraped off plates and resuspended in 140 μ l of ES medium. Undiluted Matrigel (60 μ l) was added before subcutaneous injection into *Rag2*^{-/-} γ C^{-/-} mice. After 8–12 weeks, tumors were isolated and fixed in 10% formalin. Sections were stained for germ layer analysis. Spontaneous differentiation was achieved by embryoid body formation¹⁷.

Antibodies and flow cytometry analysis. Monoclonal antibodies directly conjugated to fluorescent dye were used for iPSCs (SSEA4, eBioscience; TRA-1-81, BD) and for the sorting and characterization of hematopoietic cells (CD34, Beckman; CD43 (clone L10), CD42 (clone GRP-P) and GPA (clone CLB-ery-1 (AME-1)), Invitrogen; CD41 (clone HIP2) and CD14 (clone M5E2), Pharmingen). Cells were sorted on an Influx flow cytometer (BD) and analyzed on a FACSCanto II (BD). iPSC colonies were stained by an alkaline phosphatase reaction (Stemgen).

Quantitative RT-PCR and gene expression array analysis. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini kit (Qiagen), and cDNA was synthesized by SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were carried out on the ABI Prism GeneAmp 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Life Technologies), using Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen) and TaqMan gene expression assays for *TCL1A*, *BDKRB1*, *BDKRB2*, *ATG2B* and *GSKIP* (Applied Biosystems, Life Technologies). The expression for all genes was calculated relative to the levels of *PPIA* or *HPRT1*. For microarray analysis, RNA was hybridized to Agilent 4X44K arrays

according to the manufacturer's protocols. Analysis was performed using Bioconductor and Rosetta Resolver (Microsoft). Gene set class comparison was performed with KEGG to classify regulated genes.

Karyotypes and CGH arrays. CGH arrays for CD34⁺ cells and iPSCs were conducted on the human CGH 2x400K platform (G4448A, Agilent Technologies) by hybridization of sample versus matched normal commercially available reference, and hierarchical clustering was performed. Karyotype analysis was performed using standard procedures on R-banded metaphase spreads (450–600 bands).

Linkage analysis, microsatellite genotyping and single-nucleotide array analysis. Families F1 and F2 were subjected to a genome scan using the 6 K Illumina SNP genotyping Linkage IVb panel on a BeadStation system (Illumina). Allele detection and genotype calling were performed using BeadStudio software (Illumina). Genotype data from the genome scan were subjected to parametric linkage analyses in MERLIN using a dominant model with incomplete penetrance (0.8), a disease allele frequency of 0.000005 and no phenocopy.

A total of 16 microsatellite markers spanning the chromosome 14 candidate regions were added to the analysis. All microsatellites were analyzed by electrophoresis on the ABI3730 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems), and data were collected and analyzed using GENESCAN software Version 4.0 (PE Applied Biosystems). Multipoint parametric linkage analysis was performed in ALLEGRO using a dominant model with incomplete penetrance (0.8), a disease allele frequency of 0.000005 and no phenocopy. Microsatellite allele frequencies were deduced from a matched control population ($n = 33$).

SNP array analysis. Five affected cases (F1:II-2, F1:II-5, F1:II-7, F2:III-2 and F2:III-7; Fig. 1) and one unaffected control (F1:I-2) were genotyped using the Illumina Human CNV 370 BeadChip. Results were analyzed with the genome viewer in Illumina GenomeStudio software. The duplicated region was further confirmed by qRT-PCR based on SYBR Green I fluorescence using the ABI 7900 Sequence Detection System (Life Technologies, Thermo Scientific). Primers were designed mapping to two genes in proximal and distal parts of the duplicated region, and PCR was carried out in a 20- μ l reaction using SYBR Green I PCR Master Mix (Life Technologies) together with 300 nmol/l of each primer and 20 ng of DNA. We used as reference the β -globin gene (*HBB*). The number of copies was determined as previously described⁶¹. Primer sequences are available in **Supplementary Table 2**.

Characterization of the duplication. The breakpoints of the duplicated motif were determined by quantitative RT-PCR based on SYBR Green I fluorescence. Oligonucleotides were designed for 12 amplicons between 100 and 200 bp in length (**Supplementary Table 2**). Refinement of the breakpoints and determination of the orientation of the two duplicated motifs were carried out by PCR and agarose gel electrophoresis (Chr14_B2C2.1F and Chr14_B1C2.3R; Fig. 2c) followed by sequencing analysis (Chr14_B2C2.1F/Chr14dup_joncR and Chr14dup_joncF/Chr14_B1C2.3R; Fig. 2d).

Targeted sequencing and whole-exome sequencing. Primers were designed with Primer3plus. The coding sequence and exon-intron boundaries of candidate genes were amplified, and PCR products were sequenced in both directions with the ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit (Life Technologies) on an ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer. Sequences were analyzed with Seqscape software v 2.2 (Life Technologies), and variants identified were analyzed with Alamutv2 software (Interactive Biosoftware). Signaling mutations of *JAK2* (c.1849G>T, p.Val617Phe), *MPL* (c.1544G>T, p.Trp515Leu) and *CALR* (c.1099_1150del, p.Leu367Thrfs*46 and c.1154_1155ins, p.Lys385Asnfs*47) were analyzed as previously described⁵³. The spectrum of other acquired events was determined by Sanger sequencing of *IDH1* and *IDH2* (exons 4 and 5), *ASXL1* (exons 12 and 13) and the entire coding regions of *TET2*, *EZH2*, *DNMT3A* and *TP53*.

Whole-exome sequencing was performed using the HiSeq 2000 platform after capture with the Agilent kit (SureSelect v4). We analyzed the results by comparing CD3⁺ non-tumoral cells to either CD34⁺ cells or iPSCs and by

comparing CD34⁺ cells to iPSCs (CD3⁺ and CD34⁺ cells were purified by CD34 or CD3 microbead kit (Miltenyi Biotec, 130-046-702 and 130-050-101)).

Immunoblot analysis. Signaling studies were performed on cultured erythroblasts after overnight cytokine deprivation in serum-free medium. Stimulation by EPO (10 U/ml) for 15 min served as a positive control. Samples were subjected to immunoblot analysis using polyclonal antibodies against the phosphorylated forms of STAT5 (Tyr694, 9359), ERK1 and ERK2 (Thr202/Tyr204, 9101) and AKT (Ser473, 9271) and the LC3I/II form of LC3 (12741) (Cell Signaling Technology). HSC70 was used as a loading control, and the corresponding antibody was from Stressgen.

Constructs and viral particle production. The sequences for shRNAs targeting human *ATG2B* and *GSKIP* (**Supplementary Table 2**) were vectorized either in PLKO.1-puromycin-Ubc-turboGFP (Sigma-Aldrich) or PRRLsin-PGK-eGFP-WPRE for *GSKIP* shRNA or in PRRLsin-PGK-mCherry-WPRE for *ATG2B* shRNA (Généthon). Lentivirus particles were produced as previously described⁶². iPSC-derived CD34⁺ cells or CD34⁺ cells were transduced with lentivirus encoding shRNA for *GSKIP* or *ATG2B* and sorted for GFP or mCherry, respectively, on the BD Influx sorter. Alternatively, we used selection with puromycin.

Statistics. Data are presented as means (\pm s.d. or s.e.m.). Statistical significance was determined by Student's *t* test or Mann-Whitney Wilcoxon test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. A Bonferroni test was performed in instances involving testing of multiple parameters. All the tests were two-tailed and unpaired.

57. Tefferi, A. *et al.* Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* **110**, 1092–1097 (2007).
58. Malak, S., Labopin, M., Saint-Martin, C., Bellanne-Chantelot, C. & Najman, A. Long term follow up of 93 families with myeloproliferative neoplasms: life expectancy and implications of *JAK2*^{N617F} in the occurrence of complications. *Blood Cells Mol. Dis.* **49**, 170–176 (2012).
59. Mali, P. *et al.* Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* **26**, 1998–2005 (2008).
60. Debili, N. *et al.* Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood* **88**, 1284–1296 (1996).
61. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
62. Plo, I. *et al.* JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* **112**, 1402–1412 (2008).

Bibliographie

1. Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007; 109: 71-77.
2. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; 6: 372-375.
3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-951.
4. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 2013; 27: 1874-1881.
5. Barbui T, Thiele J, Passamonti F et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3179-3184.
6. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H et al. Masked polycythemia vera (mPV): results of an international study. *Am J Hematol* 2014; 89: 52-54.
7. Barbui T, Thiele J, Carobbio A et al. Disease characteristics and clinical outcome in young adults with essential thrombocythemia versus early/prefibrotic primary myelofibrosis. *Blood* 2012; 120: 569-571.
8. Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014; 28: 1407-1413.
9. Barbui T, Thiele J, Kvasnicka HM et al. Essential thrombocythemia with high hemoglobin levels according to the revised WHO classification. *Leukemia* 2014; 28: 2092-2094.
10. Finazzi G, low-dose aspirin in p. A prospective analysis of thrombotic events in the European collaboration study on low-dose aspirin in polycythemia (ECLAP). *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52: 285-288.
11. Barbui T, Carobbio A, Rumi E et al. In contemporary patients with polycythemia vera, rates of thrombosis and risk factors delineate a new clinical epidemiology. *Blood* 2014; 124: 3021-3023.
12. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood* 2011; 117: 5857-5859.
13. Finazzi G, Carobbio A, Guglielmelli P et al. Calreticulin mutation does not modify the IPSET score for predicting the risk of thrombosis among 1150 patients with essential thrombocythemia. *Blood* 2014; 124: 2611-2612.
14. Yang Y, Wang X, Wang C, Qin Y. A meta-analysis comparing clinical characteristics and outcomes in CALR-mutated and JAK2V617F essential thrombocythaemia. *Int J Hematol* 2015; 101: 165-172.
15. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood* 2012; 120: 5128-5133; quiz 5252.
16. Passamonti F, Thiele J, Girodon F et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2012; 120: 1197-1201.
17. Khanal N, Giri S, Upadhyay S et al. Risk of second primary malignancies and survival of adult patients with polycythemia vera: A United States population-based retrospective study. *Leuk Lymphoma* 2015; 1-5.

18. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood* 2005; 105: 2664-2670.
19. Hultcrantz M, Kristinsson SY, Andersson TM et al. Patterns of survival among patients with myeloproliferative neoplasms diagnosed in Sweden from 1973 to 2008: a population-based study. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2995-3001.
20. Bonicelli G, Abdulkarim K, Mounier M et al. Leucocytosis and thrombosis at diagnosis are associated with poor survival in polycythaemia vera: a population-based study of 327 patients. *Br J Haematol* 2013; 160: 251-254.
21. Kiladjan JJ, Chevret S, Dosquet C et al. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3907-3913.
22. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 2014; 124: 2507-2513; quiz 2615.
23. Tefferi A, Wassie EA, Lasho TL et al. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2014; 28: 2300-2303.
24. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009; 113: 2895-2901.
25. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood* 2010; 115: 1703-1708.
26. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol* 2011; 29: 392-397.
27. Vannucchi AM. Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System (MIPSS) for Primary Myelofibrosis: An AGIMM & IWG-MRT Project In ASH. San Francisco: 2014.
28. Tefferi A. Integration of Mutations and Karyotype Towards a Genetics-Based Prognostic Scoring System (GPSS) for Primary Myelofibrosis In ASH. San Francisco: 2014.
29. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004; 350: 114-124.
30. Alvarez-Larran A, Cervantes F, Pereira A et al. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood* 2010; 116: 1205-1210; quiz 1387.
31. Budde U, Schaefer G, Mueller N et al. Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood* 1984; 64: 981-985.
32. Lancellotti S, Dragani A, Ranalli P et al. Qualitative and quantitative modifications of von Willebrand factor in patients with essential thrombocythemia and controlled platelet count. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 1226-1237.
33. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2013; 368: 22-33.
34. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 1132-1136.
35. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Manshouri T et al. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with

- advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5418-5424.
36. Kiladjan JJ, Cassinat B, Chevret S et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood* 2008; 112: 3065-3072.
37. Alvarez-Larran A, Martinez-Aviles L, Hernandez-Boluda JC et al. Busulfan in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia refractory or intolerant to hydroxyurea. *Ann Hematol* 2014; 93: 2037-2043.
38. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 33-45.
39. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood* 2013; 121: 1720-1728.
40. Tefferi A, Passamonti F. Essential thrombocythemia and pregnancy: Observations from recent studies and management recommendations. *Am J Hematol* 2009; 84: 629-630.
41. Vannucchi AM, Kiladjan JJ, Grieshammer M et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med* 2015; 372: 426-435.
42. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. *JAMA Oncol* 2015; 1: 97-105.
43. Harrison C, Kiladjan JJ, Al-Ali HK et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012; 366: 787-798.
44. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012; 366: 799-807.
45. Pardanani A, Laborde RR, Lasho TL et al. Safety and efficacy of CYT387, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *Leukemia* 2013; 27: 1322-1327.
46. Harrison CN, Mesa RA, Kiladjan JJ et al. Health-related quality of life and symptoms in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib versus best available therapy. *Br J Haematol* 2013; 162: 229-239.
47. Tefferi A, Litzow MR, Pardanani A. Long-term outcome of treatment with ruxolitinib in myelofibrosis. *N Engl J Med* 2011; 365: 1455-1457.
48. Koppikar P, Abdel-Wahab O, Hedvat C et al. Efficacy of the JAK2 inhibitor INCB16562 in a murine model of MPLW515L-induced thrombocytosis and myelofibrosis. *Blood* 2010; 115: 2919-2927.
49. Wang X, Ye F, Tripodi J et al. JAK2 inhibitors do not affect stem cells present in the spleens of patients with myelofibrosis. *Blood* 2014; 124: 2987-2995.
50. Heine A, Held SA, Daecke SN et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood* 2013; 122: 1192-1202.
51. Abdelrahman RA, Begna KH, Al-Kali A et al. Momelotinib treatment-emergent neuropathy: prevalence, risk factors and outcome in 100 patients with myelofibrosis. *Br J Haematol* 2015; 169: 77-80.
52. Komrokji RS, Seymour JF, Roberts AW et al. Results of a phase 2 study of pacritinib (SB1518), a JAK2/JAK2(V617F) inhibitor, in patients with myelofibrosis. *Blood* 2015; 125: 2649-2655.
53. Pardanani A, Tefferi A, Jamieson C et al. A phase 2 randomized dose-ranging study of the JAK2-selective inhibitor fedratinib (SAR302503) in patients with myelofibrosis. *Blood Cancer J* 2015; 5: e335.
54. Pardanani A, Harrison C, Cortes JE et al. Safety and Efficacy of Fedratinib in Patients With Primary or Secondary Myelofibrosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2015; 1: 643-651.

55. Stubig T, Alchalby H, Ditschkowski M et al. JAK inhibition with ruxolitinib as pretreatment for allogeneic stem cell transplantation in primary or post-ET/PV myelofibrosis. *Leukemia* 2014; 28: 1736-1738.
56. Ballinger TJ, Savani BN, Gupta V et al. How we manage JAK inhibition in allogeneic transplantation for myelofibrosis. *Eur J Haematol* 2015; 94: 115-119.
57. Tefferi A. *Imetelstat, a Telomerase Inhibitor, Therapy for Myelofibrosis: A Pilot Study In ASH*. San Francisco: 2014.
58. Baerlocher GM. Monitoring of Calr Allele Burden in Patients with Essential Thrombocythemia Treated with Imetelstat, a Telomerase Inhibitor, Reveals Rapid and Substantial Molecular Responses In ASH. San Francisco: 2014.
59. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW et al. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 369-398.
60. Leonard WJ. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol* 2001; 73: 271-277.
61. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3387-3395.
62. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem* 2002; 277: 47954-47963.
63. Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol* 1996; 266: 383-402.
64. Al-Lazikani B, Sheinerman FB, Honig B. Combining multiple structure and sequence alignments to improve sequence detection and alignment: application to the SH2 domains of Janus kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 14796-14801.
65. Radtke S, Haan S, Jorissen A et al. The Jak1 SH2 domain does not fulfill a classical SH2 function in Jak/STAT signaling but plays a structural role for receptor interaction and up-regulation of receptor surface expression. *J Biol Chem* 2005; 280: 25760-25768.
66. Wallweber HJ, Tam C, Franke Y et al. Structural basis of recognition of interferon-alpha receptor by tyrosine kinase 2. *Nat Struct Mol Biol* 2014; 21: 443-448.
67. Girault JA, Costa A, Derkinderen P et al. FAK and PYK2/CAKbeta in the nervous system: a link between neuronal activity, plasticity and survival? *Trends Neurosci* 1999; 22: 257-263.
68. Vainchenker W, Dusa A, Constantinescu SN. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19: 385-393.
69. Harpur AG, Andres AC, Ziemiecki A et al. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* 1992; 7: 1347-1353.
70. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 2001; 8: 1327-1338.
71. Meenhuis A, Irandoust M, Wolfler A et al. Janus kinases promote cell-surface expression and provoke autonomous signalling from routing-defective G-CSF receptors. *Biochem J* 2009; 417: 737-746.
72. Royer Y, Staerk J, Costuleanu M et al. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J Biol Chem* 2005; 280: 27251-27261.
73. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995; 377: 591-594.
74. Neubauer H, Cumano A, Muller M et al. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 1998; 93: 397-409.

75. Grisouard J, Hao-Shen H, Dirnhofer S et al. Selective deletion of Jak2 in adult mouse hematopoietic cells leads to lethal anemia and thrombocytopenia. *Haematologica* 2014; 99: e52-54.
76. Horan T, Wen J, Narhi L et al. Dimerization of the extracellular domain of granulocyte-colony stimulating factor receptor by ligand binding: a monovalent ligand induces 2:2 complexes. *Biochemistry* 1996; 35: 4886-4896.
77. Livnah O, Stura EA, Middleton SA et al. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 1999; 283: 987-990.
78. Constantinescu SN, Keren T, Socolovsky M et al. Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4379-4384.
79. Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T et al. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 2497-2501.
80. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993; 74: 227-236.
81. Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 1996; 84: 331-334.
82. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000; 19: 2628-2637.
83. Hiles ID, Otsu M, Volinia S et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 1992; 70: 419-429.
84. Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC et al. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995; 80: 729-738.
85. Jiao H, Berrada K, Yang W et al. Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6985-6992.
86. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 114-119.
87. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K et al. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 1997; 89: 3148-3154.
88. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999; 18: 1309-1320.
89. Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T et al. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 2000; 275: 29338-29347.
90. Frantsve J, Schwaller J, Sternberg DW et al. Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3547-3557.
91. Tong W, Lodish HF. Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med* 2004; 200: 569-580.
92. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* 2005; 105: 4604-4612.
93. Liu B, Liao J, Rao X et al. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10626-10631.

94. Helgason CD, Damen JE, Rosten P et al. Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev* 1998; 12: 1610-1620.
95. James C, Ugo V, Le Couedic JP et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-1148.
96. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779-1790.
97. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
98. Levine RL, Wadleigh M, Cools J et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387-397.
99. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 3377-3379.
100. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2005; 106: 1207-1209.
101. Jones AV, Kreil S, Zoi K et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106: 2162-2168.
102. Renneville A, Quesnel B, Charpentier A et al. High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia* 2006; 20: 2067-2070.
103. Steensma DP, McClure RF, Karp JE et al. JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained. *Leukemia* 2006; 20: 971-978.
104. Marty C, Lacout C, Martin A et al. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood* 2010; 116: 783-787.
105. 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: 3931-3940.
106. Xing S, Wanting TH, Zhao W et al. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. *Blood* 2008; 111: 5109-5117.
107. Chen E, Beer PA, Godfrey AL et al. Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. *Cancer Cell* 2010; 18: 524-535.
108. Duek A, Lundberg P, Shimizu T et al. Loss of Stat1 decreases megakaryopoiesis and favors erythropoiesis in a JAK2-V617F-driven mouse model of MPNs. *Blood* 2014; 123: 3943-3950.
109. Tapper W, Jones AV, Kralovics R et al. Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat Commun* 2015; 6: 6691.
110. Shimizu T. JAK2V617F and Loss of Ezh2 in Hematopoietic Cells Contribute Synergistically to Myeloproliferative Neoplasm Initiation Potential, and Accelerate Progression of Disease. In *ASH*. San Francisco: 2014.
111. Yang Y. In *Mice LoEIEaAtDoMiJVFK-i* (ed) *ASH*. San Francisco: 2014.
112. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2015; 372: 601-612.
113. Nangalia J, Nice FL, Wedge DCD et al. DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype. *Haematologica* 2015.

114. Scott LM, Tong W, Levine RL et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 459-468.
115. Passamonti F, Elena C, Schnittger S et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* 2011; 117: 2813-2816.
116. Foster DC, Sprecher CA, Grant FJ et al. Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 13023-13027.
117. Shinjo K, Takeshita A, Nakamura S et al. Serum thrombopoietin levels in patients correlate inversely with platelet counts during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Leukemia* 1998; 12: 295-300.
118. Murone M, Carpenter DA, de Sauvage FJ. Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. *Stem Cells* 1998; 16: 1-6.
119. Alexander WS, Dunn AR. Structure and transcription of the genomic locus encoding murine c-Mpl, a receptor for thrombopoietin. *Oncogene* 1995; 10: 795-803.
120. Debili N, Wendling F, Cosman D et al. The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood* 1995; 85: 391-401.
121. Broudy VC, Lin NL, Sabath DF et al. Human platelets display high-affinity receptors for thrombopoietin. *Blood* 1997; 89: 1896-1904.
122. Ng AP, Kauppi M, Metcalf D et al. Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 5884-5889.
123. Villeval JL, Cohen-Solal K, Tulliez M et al. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood* 1997; 90: 4369-4383.
124. Zhou W, Toombs CF, Zou T et al. Transgenic mice overexpressing human c-mpl ligand exhibit chronic thrombocytosis and display enhanced recovery from 5-fluorouracil or antiplatelet serum treatment. *Blood* 1997; 89: 1551-1559.
125. Kakumitsu H, Kamezaki K, Shimoda K et al. Transgenic mice overexpressing murine thrombopoietin develop myelofibrosis and osteosclerosis. *Leuk Res* 2005; 29: 761-769.
126. Tiedt R, Coers J, Ziegler S et al. Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. *Blood* 2009; 113: 1768-1777.
127. Drachman JG, Millett KM, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem* 1999; 274: 13480-13484.
128. Drachman JG, Sabath DF, Fox NE, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood* 1997; 89: 483-492.
129. Miyakawa Y, Rojnuckarin P, Habib T, Kaushansky K. Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 2494-2502.
130. Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood* 1999; 94: 1273-1282.
131. Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA et al. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* 1996; 87: 2162-2170.
132. Debili N, Wendling F, Katz A et al. The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood* 1995; 86: 2516-2525.

133. Besancenot R, Roos-Weil D, Tonetti C et al. JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation. *Blood* 2014; 124: 2104-2115.
134. Pikman Y, Lee BH, Mercher T et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3: e270.
135. Staerk J, Lacout C, Sato T et al. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood* 2006; 107: 1864-1871.
136. Marty C, Chaligne R, Lacout C et al. Ligand-independent thrombopoietin mutant receptor requires cell surface localization for endogenous activity. *J Biol Chem* 2009; 284: 11781-11791.
137. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008; 112: 141-149.
138. Chaligne R, Tonetti C, Besancenot R et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia* 2008; 22: 1557-1566.
139. Ding J, Komatsu H, Wakita A et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 2004; 103: 4198-4200.
140. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108: 3472-3476.
141. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E et al. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2009; 417: 651-666.
142. Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E et al. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol* 1999; 144: 857-868.
143. Chi J, Manoloukos M, Pierides C et al. Calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms and new methodology for their detection and monitoring. *Ann Hematol* 2015; 94: 399-408.
144. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013; 369: 2379-2390.
145. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013; 369: 2391-2405.
146. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014; 28: 1472-1477.
147. Broseus J, Park JH, Carillo S et al. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. *Blood* 2014; 124: 3964-3966.
148. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* 2015; 29: 249-252.
149. Chen CC, Gau JP, Chou HJ et al. Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia. *Ann Hematol* 2014; 93: 2029-2036.
150. Xu N, Ding L, Yin C et al. A report on the co-occurrence of JAK2V617F and CALR mutations in myeloproliferative neoplasm patients. *Ann Hematol* 2015; 94: 865-867.
151. Al Assaf C, Van Obbergh F, Billiet J et al. Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica* 2015; 100: 893-897.

152. McGaffin G, Harper K, Stirling D, McLintock L. JAK2 V617F and CALR mutations are not mutually exclusive; findings from retrospective analysis of a small patient cohort. *Br J Haematol* 2014; 167: 276-278.
153. Loghavi S, Pemmaraju N, Kanagal-Shamanna R et al. Insights from response to tyrosine kinase inhibitor therapy in a rare myeloproliferative neoplasm with CALR mutation and BCR-ABL1. *Blood* 2015; 125: 3360-3363.
154. Cabagnols X, Cayuela JM, Vainchenker W. A CALR mutation preceding BCR-ABL1 in an atypical myeloproliferative neoplasm. *N Engl J Med* 2015; 372: 688-690.
155. Bonzheim I, Mankel B, Klapthor P et al. CALR-mutated essential thrombocythemia evolving to chronic myeloid leukemia with coexistent CALR mutation and BCR-ABL translocation. *Blood* 2015; 125: 2309-2311.
156. Yamada O, Mahfoudhi E, Plo I et al. Emergence of a BCR-ABL translocation in a patient with the JAK2V617F mutation: evidence for secondary acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F clone. *J Clin Oncol* 2014; 32: e76-79.
157. Marty C. Calr Mutants Retroviral Mouse Models Lead to a Myeloproliferative Neoplasm Mimicking an Essential Thrombocythemia Progressing to a Myelofibrosis In ASH. San Francisco: 2014.
158. Rumi E, Pietra D, Ferretti V et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014; 123: 1544-1551.
159. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014; 123: 1552-1555.
160. Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H et al. Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6109-6116.
161. Pardanani A, Lasho T, Finke C et al. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia* 2010; 24: 1713-1718.
162. Oh ST, Simonds EF, Jones C et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010; 116: 988-992.
163. Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J Exp Med* 2002; 195: 1599-1611.
164. Schwaab J, Ernst T, Erben P et al. Activating CBL mutations are associated with a distinct MDS/MPN phenotype. *Ann Hematol* 2012; 91: 1713-1720.
165. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013; 27: 1861-1869.
166. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 113: 6182-6192.
167. Klampfl T, Milosevic JD, Puda A et al. Complex patterns of chromosome 11 aberrations in myeloid malignancies target CBL, MLL, DDB1 and LMO2. *PLoS One* 2013; 8: e77819.
168. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011; 478: 64-69.
169. Zhang SJ, Rampal R, Manshouri T et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood* 2012; 119: 4480-4485.

170. Lasho TL, Jimma T, Finke CM et al. SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood* 2012; 120: 4168-4171.
171. Lasho TL, Finke CM, Hanson CA et al. SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients. *Leukemia* 2012; 26: 1135-1137.
172. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324: 930-935.
173. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009; 360: 2289-2301.
174. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009; 114: 144-147.
175. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 2009; 23: 905-911.
176. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 2011; 20: 11-24.
177. Quivoron C, Couronne L, Della Valle V et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2011; 20: 25-38.
178. Ko M, Bandukwala HS, An J et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 14566-14571.
179. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2015; 125: 327-335.
180. Busque L, Patel JP, Figueroa ME et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet* 2012; 44: 1179-1181.
181. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009; 361: 1058-1066.
182. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010; 18: 553-567.
183. Janin M, Mylonas E, Saada V et al. Serum 2-hydroxyglutarate production in IDH1- and IDH2-mutated de novo acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 2014; 32: 297-305.
184. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM et al. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2010; 24: 1146-1151.
185. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* 2010; 24: 1302-1309.
186. Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF et al. DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011; 25: 1217-1219.
187. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R et al. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011; 25: 1219-1220.
188. Challen GA, Sun D, Jeong M et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet* 2012; 44: 23-31.

189. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 145: 788-800.
190. Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J et al. The most commonly reported variant in ASXL1 (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia* 2010; 24: 1656-1657.
191. Abdel-Wahab O, Gao J, Adli M et al. Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med* 2013; 210: 2641-2659.
192. Milosevic JD, Puda A, Malcovati L et al. Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2012; 87: 1010-1016.
193. Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 lesions in leukemic transformation. *N Engl J Med* 2011; 364: 488-490.
194. Parant J, Chavez-Reyes A, Little NA et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet* 2001; 29: 92-95.
195. Jager R, Gisslinger H, Passamonti F et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2010; 24: 1290-1298.
196. Kano G, Morimoto A, Takanashi M et al. Ikaros dominant negative isoform (Ik6) induces IL-3-independent survival of murine pro-B lymphocytes by activating JAK-STAT and up-regulating Bcl-xl levels. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 965-973.
197. Truscott M, Harada R, Vadnais C et al. p110 CUX1 cooperates with E2F transcription factors in the transcriptional activation of cell cycle-regulated genes. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 3127-3138.
198. Allen C, Lambert JR, Linch DC, Gale RE. X chromosome inactivation analysis reveals a difference in the biology of ET patients with JAK2 and CALR mutations. *Blood* 2014; 124: 2091-2093.
199. Lundberg P, Takizawa H, Kubovcakova L et al. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *J Exp Med* 2014; 211: 2213-2230.
200. Green A, Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2010; 362: 369-370.
201. Beer PA, Ortmann CA, Stegelmann F et al. Molecular mechanisms associated with leukemic transformation of MPL-mutant myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2010; 95: 2153-2156.
202. Beer PA, Delhommeau F, LeCouedic JP et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood* 2010; 115: 2891-2900.
203. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY et al. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood* 2008; 112: 2199-2204.
204. Lundberg P, Karow A, Nienhold R et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014; 123: 2220-2228.
205. McKerrell T, Park N, Moreno T et al. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep* 2015; 10: 1239-1245.
206. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* 2014; 371: 2488-2498.
207. Jacobs KB, Yeager M, Zhou W et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat Genet* 2012; 44: 651-658.

208. Xu X, Zhang Q, Luo J et al. JAK2(V617F): Prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood* 2007; 109: 339-342.
209. Xie M, Lu C, Wang J et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* 2014; 20: 1472-1478.
210. Jones AV, Chase A, Silver RT et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009; 41: 446-449.
211. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jager R et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009; 41: 450-454.
212. Jones AV, Campbell PJ, Beer PA et al. The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010; 115: 4517-4523.
213. Koren A, Handsaker RE, Kamitaki N et al. Genetic variation in human DNA replication timing. *Cell* 2014; 159: 1015-1026.
214. Soler G, Bernal-Vicente A, Anton AI et al. The JAK2 46/1 haplotype does not predispose to CALR-mutated myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol* 2015; 94: 789-794.
215. Gau JP, Chen CC, Chou YS et al. No increase of JAK2 46/1 haplotype frequency in essential thrombocythemia with CALR mutations: Functional effect of the haplotype limited to allele with JAK2V617F mutation but not CALR mutation. *Blood Cells Mol Dis* 2015; 55: 36-39.
216. Oddsson A, Kristinsson SY, Helgason H et al. The germline sequence variant rs2736100_C in TERT associates with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014; 28: 1371-1374.
217. Jager R, Harutyunyan AS, Rumi E et al. Common germline variation at the TERT locus contributes to familial clustering of myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* 2014; 89: 1107-1110.
218. Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG et al. Familial chronic myeloproliferative disorders: clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5630-5635.
219. Kralovics R, Stockton DW, Prchal JT. Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. *Blood* 2003; 102: 3793-3796.
220. Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108: 346-352.
221. Rumi E, Passamonti F, Picone C et al. Disease anticipation in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2008; 112: 2587-2588; author reply 2588-2589.
222. Rumi E, Passamonti F, Pietra D et al. JAK2 (V617F) as an acquired somatic mutation and a secondary genetic event associated with disease progression in familial myeloproliferative disorders. *Cancer* 2006; 107: 2206-2211.
223. Ranjan A, Penninga E, Jelsig AM et al. Inheritance of the chronic myeloproliferative neoplasms. A systematic review. *Clin Genet* 2013; 83: 99-107.
224. Malak S, Labopin M, Saint-Martin C et al. Long term follow up of 93 families with myeloproliferative neoplasms: life expectancy and implications of JAK2V617F in the occurrence of complications. *Blood Cells Mol Dis* 2012; 49: 170-176.
225. Hultcrantz M, Lund SH, Landgren O et al. Survival in patients with familial and sporadic myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2015; 125: 3665-3666.
226. Olcaydu D, Rumi E, Harutyunyan A et al. The role of the JAK2 GGCC haplotype and the TET2 gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2011; 96: 367-374.
227. Lundberg P, Nienhold R, Ambrosetti A et al. Somatic mutations in calreticulin can be found in pedigrees with familial predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014; 123: 2744-2745.

228. Rumi E, Harutyunyan AS, Pietra D et al. CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood* 2014; 123: 2416-2419.
229. Saint-Martin C, Leroy G, Delhommeau F et al. Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 114: 1628-1632.
230. Maffioli M, Genoni A, Caramazza D et al. Looking for CALR mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014; 28: 1357-1360.
231. Mead AJ, Chowdhury O, Pecquet C et al. Impact of isolated germline JAK2V617I mutation on human hematopoiesis. *Blood* 2013; 121: 4156-4165.
232. Etheridge SL, Cosgrove ME, Sangkhae V et al. A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis. *Blood* 2014; 123: 1059-1068.
233. Marty C, Saint-Martin C, Pecquet C et al. Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood* 2014; 123: 1372-1383.
234. Rumi E, Harutyunyan AS, Casetti I et al. A novel germline JAK2 mutation in familial myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* 2014; 89: 117-118.
235. Cario H, Goerttler PS, Steimle C et al. The JAK2V617F mutation is acquired secondary to the predisposing alteration in familial polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2005; 130: 800-801.
236. Pardanani A, Lasho T, McClure R et al. Discordant distribution of JAK2V617F mutation in siblings with familial myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 107: 4572-4573.
237. Saliba J, Saint-Martin C, Di Stefano A et al. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nat Genet* 2015.
238. Harutyunyan A. Germline RBBP6 Mutations In Myeloproliferative Neoplasms In ASH. New Orleans: 2013.
239. Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* 2004; 104: 19-25.
240. Arinobu Y, Mizuno S, Chong Y et al. Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 416-427.
241. Mancini E, Sanjuan-Pla A, Luciani L et al. FOG-1 and GATA-1 act sequentially to specify definitive megakaryocytic and erythroid progenitors. *EMBO J* 2012; 31: 351-365.
242. Bouilloux F, Juban G, Cohet N et al. EKLF restricts megakaryocytic differentiation at the benefit of erythrocytic differentiation. *Blood* 2008; 112: 576-584.
243. Gregory CJ, Eaves AC. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood* 1977; 49: 855-864.
244. Gregory CJ, Eaves AC. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 1978; 51: 527-537.
245. Li J, Hale J, Bhagia P et al. Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. *Blood* 2014; 124: 3636-3645.
246. Broudy VC, Lin N, Brice M et al. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 1991; 77: 2583-2590.
247. Bessis M. [Erythroblastic island, functional unity of bone marrow]. *Rev Hematol* 1958; 13: 8-11.

248. Lee SH, Crocker PR, Westaby S et al. Isolation and immunocytochemical characterization of human bone marrow stromal macrophages in hemopoietic clusters. *J Exp Med* 1988; 168: 1193-1198.
249. Stephenson JR, Axelrad AA, McLeod DL, Shreeve MM. Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 1542-1546.
250. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995; 83: 59-67.
251. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.
252. Gregory T, Yu C, Ma A et al. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 1999; 94: 87-96.
253. Flygare J, Rayon Estrada V, Shin C et al. HIF1alpha synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal. *Blood* 2011; 117: 3435-3444.
254. Hu J, Liu J, Xue F et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood* 2013; 121: 3246-3253.
255. Sinclair GD, Brasch K. The nucleated erythrocyte: a model of cell differentiation. *Rev Can Biol* 1975; 34: 287-303.
256. Liu J, Mohandas N, An X. Membrane assembly during erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2011; 18: 133-138.
257. McGrath KE, Bushnell TP, Palis J. Multispectral imaging of hematopoietic cells: where flow meets morphology. *J Immunol Methods* 2008; 336: 91-97.
258. Rylski M, Welch JJ, Chen YY et al. GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5031-5042.
259. Chen W, Dailey HA, Paw BH. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood* 2010; 116: 628-630.
260. Drissen R, von Lindern M, Kolbus A et al. The erythroid phenotype of EKLF-null mice: defects in hemoglobin metabolism and membrane stability. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 5205-5214.
261. Hodge D, Coghill E, Keys J et al. A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood* 2006; 107: 3359-3370.
262. Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* 1995; 375: 318-322.
263. Nuez B, Michalovich D, Bygrave A et al. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* 1995; 375: 316-318.
264. McGrath KE, Kingsley PD, Koniski AD et al. Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus. *Blood* 2008; 111: 2409-2417.
265. Yoshida H, Kawane K, Koike M et al. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 2005; 437: 754-758.
266. De Maria R, Zeuner A, Eramo A et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1999; 401: 489-493.
267. De Maria R, Testa U, Luchetti L et al. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 1999; 93: 796-803.
268. Socolovsky M. Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 215-224.

269. Zermati Y, Garrido C, Amsellem S et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 2001; 193: 247-254.
270. Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 2007; 445: 102-105.
271. Ney PA. Normal and disordered reticulocyte maturation. *Curr Opin Hematol* 2011; 18: 152-157.
272. Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 1998; 80: 173-195.
273. Frede S, Freitag P, Geuting L et al. Oxygen-regulated expression of the erythropoietin gene in the human renal cell line REPC. *Blood* 2011; 117: 4905-4914.
274. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; 313: 806-810.
275. Fisher JW, Koury S, Ducey T, Mendel S. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *Br J Haematol* 1996; 95: 27-32.
276. Scortegagna M, Morris MA, Oktay Y et al. The HIF family member EPAS1/HIF-2alpha is required for normal hematopoiesis in mice. *Blood* 2003; 102: 1634-1640.
277. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J* 2004; 18: 1462-1464.
278. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* 2010; 116: 3039-3048.
279. Beck I, Ramirez S, Weinmann R, Caro J. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 15563-15566.
280. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC et al. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* 1989; 74: 645-651.
281. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev* 2013; 27: 41-53.
282. Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 1999; 274: 24147-24152.
283. Hofer T, Wenger RH, Kramer MF et al. Hypoxic up-regulation of erythroid 5-aminolevulinate synthase. *Blood* 2003; 101: 348-350.
284. Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: F1-13.
285. Zhang FL, Shen GM, Liu XL et al. Hypoxic induction of human erythroid-specific delta-aminolevulinate synthase mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Biochemistry* 2011; 50: 1194-1202.
286. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002; 110: 1037-1044.
287. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 2007; 117: 1926-1932.
288. Liu Y, Pop R, Sadegh C et al. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* 2006; 108: 123-133.

289. Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL et al. A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 265-270.
290. D'Andrea AD, Zon LI. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J Clin Invest* 1990; 86: 681-687.
291. D'Andrea AD, Fasman GD, Lodish HF. Erythropoietin receptor and interleukin-2 receptor beta chain: a new receptor family. *Cell* 1989; 58: 1023-1024.
292. Noguchi CT, Wang L, Rogers HM et al. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10: e36.
293. Winkelmann JC, Penny LA, Deaven LL et al. The gene for the human erythropoietin receptor: analysis of the coding sequence and assignment to chromosome 19p. *Blood* 1990; 76: 24-30.
294. Budarf M, Huebner K, Emanuel B et al. Assignment of the erythropoietin receptor (EPOR) gene to mouse chromosome 9 and human chromosome 19. *Genomics* 1990; 8: 575-578.
295. Wickrema A, Krantz SB, Winkelmann JC, Bondurant MC. Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells. *Blood* 1992; 80: 1940-1949.
296. Wickrema A, Bondurant MC, Krantz SB. Abundance and stability of erythropoietin receptor mRNA in mouse erythroid progenitor cells. *Blood* 1991; 78: 2269-2275.
297. Jones SS, D'Andrea AD, Haines LL, Wong GG. Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. *Blood* 1990; 76: 31-35.
298. Livnah O, Stura EA, Johnson DL et al. Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science* 1996; 273: 464-471.
299. Hilton DJ, Watowich SS, Murray PJ, Lodish HF. Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 190-194.
300. Hilton DJ, Watowich SS, Katz L, Lodish HF. Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 4699-4708.
301. Tanner JW, Chen W, Young RL et al. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem* 1995; 270: 6523-6530.
302. Sawyer ST, Hankins WD. The functional form of the erythropoietin receptor is a 78-kDa protein: correlation with cell surface expression, endocytosis, and phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 6849-6853.
303. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z et al. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 2005; 105: 600-608.
304. Watowich SS, Yoshimura A, Longmore GD et al. Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 2140-2144.
305. Kubatzky KF, Ruan W, Gurezka R et al. Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr Biol* 2001; 11: 110-115.
306. Syed RS, Reid SW, Li C et al. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* 1998; 395: 511-516.
307. Seubert N, Royer Y, Staerk J et al. Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer. *Mol Cell* 2003; 12: 1239-1250.
308. Lu X, Gross AW, Lodish HF. Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *J Biol Chem* 2006; 281: 7002-7011.

309. Constantinescu SN, Huang LJ, Nam H, Lodish HF. The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. *Mol Cell* 2001; 7: 377-385.
310. Dusanter-Fourt I, Muller O, Ziemiecki A et al. Identification of JAK protein tyrosine kinases as signaling molecules for prolactin. Functional analysis of prolactin receptor and prolactin-erythropoietin receptor chimera expressed in lymphoid cells. *EMBO J* 1994; 13: 2583-2591.
311. Miura O, Nakamura N, Quelle FW et al. Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo. *Blood* 1994; 84: 1501-1507.
312. Koch CA, Anderson D, Moran MF et al. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991; 252: 668-674.
313. Lodish H, Flygare J, Chou S. From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life* 2010; 62: 492-496.
314. Wakao H, Harada N, Kitamura T et al. Interleukin 2 and erythropoietin activate STAT5/MGF via distinct pathways. *EMBO J* 1995; 14: 2527-2535.
315. Kirito K, Nagashima T, Ozawa K, Komatsu N. Constitutive activation of Stat1 and Stat3 in primary erythroleukemia cells. *Int J Hematol* 2002; 75: 51-54.
316. Damen JE, Wakao H, Miyajima A et al. Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *EMBO J* 1995; 14: 5557-5568.
317. Klingmuller U, Bergelson S, Hsiao JG, Lodish HF. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 8324-8328.
318. Kirito K, Nakajima K, Watanabe T et al. Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood* 2002; 99: 102-110.
319. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264: 1415-1421.
320. Socolovsky M, Nam H, Fleming MD et al. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 2001; 98: 3261-3273.
321. Silva M, Grillot D, Benito A et al. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 1996; 88: 1576-1582.
322. Gregoli PA, Bondurant MC. The roles of Bcl-X(L) and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. *Blood* 1997; 90: 630-640.
323. Klingmuller U, Wu H, Hsiao JG et al. Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3016-3021.
324. Bao H, Jacobs-Helber SM, Lawson AE et al. Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood* 1999; 93: 3757-3773.
325. Haseyama Y, Sawada K, Oda A et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis. *Blood* 1999; 94: 1568-1577.
326. Damen JE, Cutler RL, Jiao H et al. Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of

- phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity. *J Biol Chem* 1995; 270: 23402-23408.
327. Verdier F, Chretien S, Billat C et al. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-2. An alternate pathway for erythropoietin-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Biol Chem* 1997; 272: 26173-26178.
328. Bouscary D, Pene F, Claessens YE et al. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* 2003; 101: 3436-3443.
329. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD et al. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* 2006; 107: 907-915.
330. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857-868.
331. Kashii Y, Uchida M, Kirito K et al. A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* 2000; 96: 941-949.
332. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW et al. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHL-1. *Curr Biol* 2000; 10: 1201-1204.
333. Bakker WJ, Blazquez-Domingo M, Kolbus A et al. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol* 2004; 164: 175-184.
334. Miura Y, Miura O, Ihle JN, Aoki N. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 29962-29969.
335. Damen JE, Liu L, Cutler RL, Krystal G. Erythropoietin stimulates the tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 and a 145-Kd tyrosine phosphorylated protein. *Blood* 1993; 82: 2296-2303.
336. Halupa A, Chohan M, Stickle NH et al. Erythropoietin receptor Y479 couples to ERK1/2 activation via recruitment of phospholipase Cgamma. *Exp Cell Res* 2005; 309: 1-11.
337. Nagata Y, Todokoro K. Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood* 1999; 94: 853-863.
338. Shan R, Price JO, Gaarde WA et al. Distinct roles of JNKs/p38 MAP kinase and ERKs in apoptosis and survival of HCD-57 cells induced by withdrawal or addition of erythropoietin. *Blood* 1999; 94: 4067-4076.
339. Kolbus A, Pilat S, Husak Z et al. Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J Exp Med* 2002; 196: 1347-1353.
340. Constantinescu SN, Ghaffari S, Lodish HF. The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 18-23.
341. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; 80: 179-185.
342. Strous GJ, Gent J. Dimerization, ubiquitylation and endocytosis go together in growth hormone receptor function. *FEBS Lett* 2002; 529: 102-109.
343. Alves dos Santos CM, ten Broeke T, Strous GJ. Growth hormone receptor ubiquitination, endocytosis, and degradation are independent of signal transduction via Janus kinase 2. *J Biol Chem* 2001; 276: 32635-32641.

344. Verdier F, Walrafen P, Hubert N et al. Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 18375-18381.
345. Bulut GB, Sulahian R, Ma Y et al. Ubiquitination regulates the internalization, endolysosomal sorting, and signaling of the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 2011; 286: 6449-6457.
346. Rouyez MC, Boucheron C, Gisselbrecht S et al. Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4991-5000.
347. Dahlen DD, Broudy VC, Drachman JG. Internalization of the thrombopoietin receptor is regulated by 2 cytoplasmic motifs. *Blood* 2003; 102: 102-108.
348. Bulut GB, Sulahian R, Yao H, Huang LJ. Cbl ubiquitination of p85 is essential for Epo-induced EpoR endocytosis. *Blood* 2013; 122: 3964-3972.
349. Sulahian R, Cleaver O, Huang LJ. Ligand-induced EpoR internalization is mediated by JAK2 and p85 and is impaired by mutations responsible for primary familial and congenital polycythemia. *Blood* 2009; 113: 5287-5297.
350. Levkowitz G, Waterman H, Zamir E et al. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 1998; 12: 3663-3674.
351. Rocca A, Lamaze C, Subtil A, Dautry-Varsat A. Involvement of the ubiquitin/proteasome system in sorting of the interleukin 2 receptor beta chain to late endocytic compartments. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 1293-1301.
352. Verdier F, Chretien S, Muller O et al. Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 28185-28190.
353. Meyer L, Deau B, Forejtnikova H et al. beta-Trcp mediates ubiquitination and degradation of the erythropoietin receptor and controls cell proliferation. *Blood* 2007; 109: 5215-5222.
354. Martinez-Moczygamba M, Huston DP. Proteasomal regulation of betac signaling reveals a novel mechanism for cytokine receptor heterotypic desensitization. *J Clin Invest* 2001; 108: 1797-1806.
355. Liu E, Jelinek J, Pastore YD et al. Discrimination of polycythemia and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood* 2003; 101: 3294-3301.
356. Bento C, Almeida H, Maia TM et al. Molecular study of congenital erythrocytosis in 70 unrelated patients revealed a potential causal mutation in less than half of the cases (Where is/are the missing gene(s)?). *Eur J Haematol* 2013; 91: 361-368.
357. Hong WJ, Gotlib J. Hereditary erythrocytosis, thrombocytosis and neutrophilia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2014; 27: 95-106.
358. Finazzi G, Gregg XT, Barbui T, Prchal JT. Idiopathic erythrocytosis and other non-clonal polycythemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 471-482.
359. de la Chapelle A, Sistonen P, Lehvaslaiho H et al. Familial erythrocytosis genetically linked to erythropoietin receptor gene. *Lancet* 1993; 341: 82-84.
360. McMullin MF, Bareford D, Campbell P et al. Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis. *Br J Haematol* 2005; 130: 174-195.
361. Gordeuk VR, Stockton DW, Prchal JT. Congenital polycythemia/erythrocytoses. *Haematologica* 2005; 90: 109-116.

362. de la Chapelle A, Traskelin AL, Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 4495-4499.
363. Kralovics R, Sokol L, Broxson EH, Jr., Prchal JT. The erythropoietin receptor gene is not linked with the polycythemia phenotype in a family with autosomal dominant primary polycythemia. *Proc Assoc Am Physicians* 1997; 109: 580-585.
364. Kralovics R, Indrak K, Stopka T et al. Two new EPO receptor mutations: truncated EPO receptors are most frequently associated with primary familial and congenital polycythemias. *Blood* 1997; 90: 2057-2061.
365. Kralovics R, Sokol L, Prchal JT. Absence of polycythemia in a child with a unique erythropoietin receptor mutation in a family with autosomal dominant primary polycythemia. *J Clin Invest* 1998; 102: 124-129.
366. Bento C, Percy MJ, Gardie B et al. Genetic basis of congenital erythrocytosis: mutation update and online databases. *Hum Mutat* 2014; 35: 15-26.
367. Van Maerken T, Hunnink K, Callewaert L et al. Familial and congenital polycythemias: a diagnostic approach. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26: 407-416.
368. Benesch RE, Benesch R, Yu CI. The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration. *Biochemistry* 1969; 8: 2567-2571.
369. Rosa R, Prehu MO, Beuzard Y, Rosa J. The first case of a complete deficiency of diphosphoglycerate mutase in human erythrocytes. *J Clin Invest* 1978; 62: 907-915.
370. Lemarchandel V, Joulin V, Valentin C et al. Compound heterozygosity in a complete erythrocyte bisphosphoglycerate mutase deficiency. *Blood* 1992; 80: 2643-2649.
371. Hoyer JD, Allen SL, Beutler E et al. Erythrocytosis due to bisphosphoglycerate mutase deficiency with concurrent glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *Am J Hematol* 2004; 75: 205-208.
372. Percy MJ, McFerran NV, Lappin TR. Disorders of oxidised haemoglobin. *Blood Rev* 2005; 19: 61-68.
373. Mansouri A, Lurie AA. Concise review: methemoglobinemia. *Am J Hematol* 1993; 42: 7-12.
374. Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG, Jr. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11661-11666.
375. Nordstrom-O'Brien M, van der Luijt RB, van Rooijen E et al. Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat* 2010; 31: 521-537.
376. Ang SO, Chen H, Hirota K et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet* 2002; 32: 614-621.
377. Gordeuk VR, Prchal JT. Vascular complications in Chuvash polycythemia. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 289-294.
378. Smith TG, Brooks JT, Balanos GM et al. Mutation of von Hippel-Lindau tumour suppressor and human cardiopulmonary physiology. *PLoS Med* 2006; 3: e290.
379. Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY et al. Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. *Blood* 2004; 103: 3924-3932.
380. Percy MJ, Zhao Q, Flores A et al. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 654-659.

381. Arcasoy MO, Degar BA, Harris KW, Forget BG. Familial erythrocytosis associated with a short deletion in the erythropoietin receptor gene. *Blood* 1997; 89: 4628-4635.
382. Sokol L, Luhovy M, Guan Y et al. Primary familial polycythemia: a frameshift mutation in the erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin. *Blood* 1995; 86: 15-22.
383. Prchal JT, Semenza GL, Prchal J, Sokol L. Familial polycythemia. *Science* 1995; 268: 1831-1832.
384. Kralovics R, Prchal JT. Genetic heterogeneity of primary familial and congenital polycythemia. *Am J Hematol* 2001; 68: 115-121.
385. Jang JH, Seo JY, Jang J et al. Hereditary gene mutations in Korean patients with isolated erythrocytosis. *Ann Hematol* 2014; 93: 931-935.
386. Gross M, Ben-Califa N, McMullin MF et al. Polycythaemia-inducing mutations in the erythropoietin receptor (EPOR): mechanism and function as elucidated by epidermal growth factor receptor-EPOR chimeras. *Br J Haematol* 2014; 165: 519-528.
387. Al-Sheikh M, Mazurier E, Gardie B et al. A study of 36 unrelated cases with pure erythrocytosis revealed three new mutations in the erythropoietin receptor gene. *Haematologica* 2008; 93: 1072-1075.
388. Arcasoy MO, Karayal AF, Segal HM et al. A novel mutation in the erythropoietin receptor gene is associated with familial erythrocytosis. *Blood* 2002; 99: 3066-3069.
389. O'Rourke K, Fairbairn DJ, Jackson KA et al. A novel mutation of the erythropoietin receptor gene associated with primary familial and congenital polycythaemia. *Int J Hematol* 2011; 93: 542-544.
390. Perrotta S, Cucciolla V, Ferraro M et al. EPO receptor gain-of-function causes hereditary polycythemia, alters CD34 cell differentiation and increases circulating endothelial precursors. *PLoS One* 2010; 5: e12015.
391. Petersen KB, Hokland P, Petersen GB, Nyvold CG. Erythropoietin receptor defect: a cause of primary polycythaemia. *Br J Haematol* 2004; 125: 537-538.
392. Rives S, Pahl HL, Florensa L et al. Molecular genetic analyses in familial and sporadic congenital primary erythrocytosis. *Haematologica* 2007; 92: 674-677.
393. Arcasoy MO, Harris KW, Forget BG. A human erythropoietin receptor gene mutant causing familial erythrocytosis is associated with deregulation of the rates of Jak2 and Stat5 inactivation. *Exp Hematol* 1999; 27: 63-74.
394. Percy MJ, McMullin MF, Roques AW et al. Erythrocytosis due to a mutation in the erythropoietin receptor gene. *Br J Haematol* 1998; 100: 407-410.
395. Chauveau A, Luque Paz D, Lecucq L et al. A new point mutation in EPOR inducing a short deletion in congenital erythrocytosis. *Br J Haematol* 2015.
396. Le Couedic JP, Mitjavila MT, Villeval JL et al. Missense mutation of the erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies. *Blood* 1996; 87: 1502-1511.
397. Sokol L, Prchal JF, D'Andrea A et al. Mutation in the negative regulatory element of the erythropoietin receptor gene in a case of sporadic primary polycythemia. *Exp Hematol* 1994; 22: 447-453.
398. Juvonen E, Ikkala E, Fyhrquist F, Ruutu T. Autosomal dominant erythrocytosis caused by increased sensitivity to erythropoietin. *Blood* 1991; 78: 3066-3069.
399. Furukawa T, Narita M, Sakaue M et al. Primary familial polycythaemia associated with a novel point mutation in the erythropoietin receptor. *Br J Haematol* 1997; 99: 222-227.

400. Watowich SS, Xie X, Klingmuller U et al. Erythropoietin receptor mutations associated with familial erythrocytosis cause hypersensitivity to erythropoietin in the heterozygous state. *Blood* 1999; 94: 2530-2532.
401. Suzuki N, Ohneda O, Takahashi S et al. Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood* 2002; 100: 2279-2288.
402. Mead A. Germline Activating JAK2 V617I Mutation in a Family with Hereditary Thrombocytosis In ASH. San Diego: 2011.
403. Elliott S, Busse L, Bass MB et al. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood* 2006; 107: 1892-1895.
404. Debili N, Coulombel L, Croisille L et al. Characterization of a bipotent erythromegakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood* 1996; 88: 1284-1296.
405. Norol F, Vitrat N, Cramer E et al. Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells. *Blood* 1998; 91: 830-843.
406. Pecquet C, Diaconu CC, Staerk J et al. Thrombopoietin receptor down-modulation by JAK2 V617F: restoration of receptor levels by inhibitors of pathologic JAK2 signaling and of proteasomes. *Blood* 2012; 119: 4625-4635.
407. Williams DM, Kim AH, Rogers O et al. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp Hematol* 2007; 35: 1641-1646.
408. Kawamata N, Ogawa S, Yamamoto G et al. Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. *Exp Hematol* 2008; 36: 1471-1479.
409. Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI et al. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11444-11447.
410. Lambert MP, Jiang J, Batra V et al. A novel mutation in MPL (Y252H) results in increased thrombopoietin sensitivity in essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2012; 87: 532-534.
411. Sangkhae V, Saur SJ, Kaushansky A et al. Phosphorylated c-Mpl tyrosine 591 regulates thrombopoietin-induced signaling. *Exp Hematol* 2014; 42: 477-486 e474.
412. Drachman JG, Kaushansky K. Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 2350-2355.
413. Hitchcock IS, Chen MM, King JR, Kaushansky K. YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation. *Blood* 2008; 112: 2222-2231.
414. Pecquet C, Staerk J, Chaligne R et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. *Blood* 2010; 115: 1037-1048.
415. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 2014; 371: 2477-2487.
416. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999; 23: 166-175.
417. Bluteau D, Gilles L, Hilpert M et al. Down-regulation of the RUNX1-target gene NR4A3 contributes to hematopoiesis deregulation in familial platelet disorder/acute myelogenous leukemia. *Blood* 2011; 118: 6310-6320.
418. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet* 2011; 43: 929-931.

419. Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2011; 43: 1012-1017.
420. Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood* 2012; 119: 1283-1291.
421. Plo I, Zhang Y, Le Couedic JP et al. An activating mutation in the CSF3R gene induces a hereditary chronic neutrophilia. *J Exp Med* 2009; 206: 1701-1707.
422. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9194-9199.
423. Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 2008; 132: 681-696.
424. Widmann TA, Willmann B, Pfreundschuh M, Beelen DW. Influence of telomere length on short-term recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2005; 33: 1257-1261.
425. Vas V, Senger K, Dorr K et al. Aging of the microenvironment influences clonality in hematopoiesis. *PLoS One* 2012; 7: e42080.