



HAL
open science

**Etude de la calréticuline dans les syndromes
myéloprolifératifs : de la détermination de la charge
allélique aux mécanismes de dégradation des variants
protéiques**

Olivier Mansier

► **To cite this version:**

Olivier Mansier. Etude de la calréticuline dans les syndromes myéloprolifératifs : de la détermination de la charge allélique aux mécanismes de dégradation des variants protéiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0832 . tel-01986672

HAL Id: tel-01986672

<https://theses.hal.science/tel-01986672>

Submitted on 19 Jan 2019

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé
SPÉCIALITÉ : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Olivier MANSIER
Né le 10 mai 1986 à Riom

**Etude de la calréticuline dans les syndromes myéloprolifératifs :
de la détermination de la charge allélique aux mécanismes de
dégradation des variants protéiques**

Sous la direction de : François-Xavier MAHON

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2017

Membres du jury :

Pr GAUSSEM Pascale	PU-PH, Université PARIS DESCARTES	Présidente
Dr PLO Isabelle	DR INSERM, Institut Gustave ROUSSY	Rapporteur
Dr MANIE Serge	DR INSERM, CRCL de LYON	Rapporteur
Pr JAMES Chloé	PU-PH, Université de BORDEAUX	Examinatrice
Dr CHEVET Eric	DR INSERM, Université de RENNES	Membre invité
Pr LIPPERT Eric	PU-PH, Université de BREST	Membre invité
Pr MAHON François-Xavier	PU-PH, Institut Bergonié	Directeur

A Amélie,

Merci de ton amour, de ta patience exemplaire et de ton soutien sans faille depuis tant d'années.

A mes parents et ma sœur,

Merci de votre soutien depuis ces quelques trente et une années

A Margot et Gabriel,

Merci d'avoir su effacer les frustrations accumulées durant la journée. Vous resterez mes plus belles réussites au cours de cette thèse.

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

Professeur Pascale Gaussem

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse et je vous en remercie. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de mon plus profond respect.

Docteur Isabelle Plo

Vous avez accepté d'assurer la charge d'être rapporteur de ce travail et de faire partie de ce jury et je vous en remercie. J'espère que ce manuscrit de thèse sera digne de vos attentes.

Docteur Serge Manié

Merci d'avoir accepté d'assurer la charge d'être rapporteur de ce travail et de faire partie de ce jury. J'espère que ce manuscrit de thèse sera au niveau de vos attentes.

Professeur Chloé James

Tu as accepté de juger ce travail et je t'en remercie. Tes enseignements au laboratoire hospitalier, ton soutien sans faille et ta passion contagieuse pour la recherche ont participé à m'orienter vers l'Hématologie et à réaliser de cette thèse. Pour cela aussi je te remercie. J'espère pouvoir construire dans les années à venir de nombreux projets autour des SMP à tes côtés.

A mes directeurs de thèse

Professeur François-Xavier Mahon

Vous m'avez accueilli dans vos laboratoires depuis 8 ans maintenant. Merci pour votre soutien continu. J'espère que vous trouverez ce travail digne de la confiance que vous m'avez accordée.

Docteur Eric Chevet

Tu as su nous guider dans ce monde qui nous était presque totalement étranger, le réticulum endoplasmique. Merci pour ton enthousiasme, tes conseils toujours avisés et surtout ton côté « antidépresseur » qui me fut si utile au cours de ces 3 années.

Professeur Eric Lippert

Après 5 années à tes côtés, tu t'en es allé râler dans des contrées éloignées. Tu as su cependant toujours rester disponible et m'as toujours encouragé au cours de ce long périple de thèse. Merci de m'avoir apporté tant de connaissances en Hématologie et de m'avoir donné le goût de la recherche. J'espère que nos collaborations à venir resteront aussi intéressantes et durables.

A l'unité INSERM U1218

Merci à toute l'équipe MLO de m'avoir encadré, aidé et conseillé au cours de ce travail : Béatrice, Bruno, Richard, Thomas, Julie. Merci à Valérie L pour ton aide, notamment suite au développement de mon allergie aux western-blots. Merci à Valérie PM d'avoir tout simplement permis la réalisation de ce projet et ma survie pendant ces 3 années. Ton soutien, tes expertises et tes conseils ont été si précieux. Merci également à Elodie d'avoir produit les lentivirus malgré des demandes toujours dans l'urgence. Enfin merci « aux petits de Béa » : Florence, Mathieu, Amine, Elodie et Kathy. Votre bonne humeur m'a permis de passer de bons moments au laboratoire.

A l'unité INSERM U1035

A l'équipe CSHNL : Vanessa, Isabelle, Sophie, Meriane, Arnaud. Merci pour ces moments de détente et de discussion. A M. Praloran, merci pour votre soutien inconditionnel et vos conseils de grand maître Jedi. A Jean-Max, merci pour tes conseils toujours précieux. A mes « grossistes » en chocolat : Mélody et Amélie. Merci, vous m'avez permis de passer le cap du « 17-18h » si souvent.

A mes « collocataires » de bureau

Pierre-Yves et Stéphane. Merci pour ces moments récréatifs dans notre « placard à Doctorants ».

Aux équipes de Biothérapie, à la plateforme de vectorologie, à l'équipe de Dermatologie et celle d'Immuno-Dermatologie. Je pense vous avoir à peu près tous emprunté du matériel, des réactifs et/ou des conseils. Merci pour ces moments agréables passés à vos côtés.

A l'équipe du laboratoire hospitalier

Aux 2 Christine, Stéphanie, Vanessa, Jean-Philippe, Nicolas, Laurent, Lisa, Emilie et l'ensemble des techniciens. C'était et ce sera de nouveau un grand plaisir de travailler avec vous tous.

A Audrey, merci de ta gentillesse et de ton aide précieuse si souvent sollicitée. A Marina, merci d'exécuter toutes ces manip avant même que j'ai fini de les demander.

A mes amis

Merci de m'avoir accompagné et supporté durant toutes ces années. Malheureusement pour vous, ça risque de continuer !

Etude de la calréticuline dans les syndromes myéloprolifératifs : de la détermination de la charge allélique aux mécanismes de dégradation des variants protéiques

Des mutations dans le gène de la *calréticuline* (*CALR*), codant pour une protéine résidente du réticulum endoplasmique (RE), ont été découvertes récemment dans les syndromes myéloprolifératifs (SMP). Elles sont associées à augmentation de prolifération cellulaire portant spécifiquement sur la lignée mégacaryocytaire. Ceci est le résultat d'une activation constitutive de la signalisation des voies JAK-STAT et MAP Kinases, consécutive à l'interaction des protéines mutantes CALR avec le récepteur à la thrombopoïétine. Plusieurs études ont montré la faible expression de ces protéines mutées dans les cellules, mais aucune n'a déterminé l'impact de leur expression sur l'homéostasie du RE ni les acteurs mis en jeu dans leur élimination. Dans ce travail, nous avons montré que l'expression des protéines CALR mutées ne perturbe pas sensiblement l'équilibre du RE et ne modifie pas la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par un stress du RE. Nous avons ensuite démontré dans différents modèles, y compris des cellules engagées dans la différenciation mégacaryocytaire, que les faibles niveaux intracellulaires de variants protéiques CALR n'étaient pas liés à une sécrétion accrue dans le milieu extracellulaire ni à un défaut transcriptionnel. Cette faible expression est en fait la conséquence d'une dégradation mettant en jeu principalement la voie ERAD-protéasome. Dans ce processus, la reconnaissance de motifs glycanes n'est pas impliquée, mais EDEM3 semble avoir un rôle majeur puisque son extinction augmente l'expression des formes mutées de CALR. La modulation de cette dégradation pourrait constituer une approche thérapeutique innovante dans les SMP.

Mots clés : Calréticuline, EDEM, Syndromes Myéloprolifératifs, ERAD, Protéasome

**INSERM U1218 ACTION, Equipe "Oncogénèse mammaire et leucémique"
Université de Bordeaux
146 rue Léo Saignat, Zone Sud, Bâtiment TP, 4ème étage
33076 Bordeaux**

Study of calreticulin in myeloproliferative neoplasms: from allelic burden determination to mechanisms of variant proteins degradation

Mutations in the *calreticulin* gene (*CALR*), encoding for an endoplasmic reticulum (ER) resident protein, have recently been discovered in myeloproliferative neoplasms (MPN). They are associated with an increased cell proliferation, specifically in the megakaryocytic lineage. This is the result of a constitutive activation of the JAK-STAT and MAP kinase pathways, following the interaction of mutant calreticulin proteins with the thrombopoietin receptor. Several studies have demonstrated that these mutated proteins are faintly expressed in cells, but none have determined the impact of their expression on ER homeostasis, nor addressed the actors at play in their degradation. In this work, we showed that the expression of mutated *CALR* proteins does not significantly disturb ER equilibrium, nor does it change the cellular sensitivity to ER stress-induced apoptosis. We next demonstrated in different models including cells committed towards megakaryocytic differentiation that the poor intracellular levels of variant *CALR* proteins are neither due to enhanced secretion into the extracellular medium, nor to transcriptional defects. This low-level expression is mainly the result of increased degradation, involving the ERAD-proteasome pathway. In this process, the recognition of glycan motifs is not engaged, but EDEM3 seems to be a key component as its extinction increases the expression levels of variant forms of *CALR*. Modulating this degradation process could represent a therapeutic option for MPN patients.

Keywords : Calreticulin, EDEM, Myeloproliferative Neoplasms, ERAD, Proteasome

**INSERM U1218 ACTION, Team "Mammary and Leukemic Oncogenesis "
University of Bordeaux
146 rue Léo Saignat, Zone Sud, Bâtiment TP, 4ème étage
33076 Bordeaux**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Présentation clinico-biologique des syndromes myéloprolifératifs classiques.....	68
Tableau 2 : Association des mutations de <i>CALR</i> à une présentation clinico-biologique spécifique dans les thrombocytémies essentielles	84
Tableau 3 : Association des mutations de <i>CALR</i> à une présentation clinico-biologique spécifique dans les myélofibrose primitives.....	85

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Principe du système de contrôle qualité des glycoprotéines sécrétées.....	23
Figure 2 : Modification co- et post-traductionnelles apportées aux protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique.....	24
Figure 3 : Structure du motif glycosylé transféré sur les résidus asparagine des glycoprotéines dans le cadre de la N-glycosylation.	25
Figure 4 : Représentation schématique des structures linéaire et tridimensionnelle de la calréticuline et de la calnexine.....	30
Figure 5 : Représentation schématique du devenir des glycoprotéines dans le RE depuis leur synthèse jusqu'à leur export ou leur dégradation.	34
Figure 6 : Représentation schématique de la structure linéaire des membres de la famille Glycosyl Hydrolase 47.....	36
Figure 7 : Représentation schématique du clivage des mannosés des chaînes glycosylées intervenant dans l'initiation de l'ERAD.	39
Figure 8 : Représentation schématique des modifications des motifs N-glycosylés.....	41
Figure 9 : Structure et composition du complexe de rétro-translocation impliqué dans la dégradation des protéines luminales du RE.....	43
Figure 10 : Représentation schématique de la sous-compartmentalisation du RE.....	46
Figure 11 : Représentation schématique de la structure linéaire des trois senseurs de l'UPR : IRE1, PERK et ATF6.	50
Figure 12 : Signalisation initiée par IRE1.....	51
Figure 13 : Voie de signalisation activée par PERK.....	52
Figure 14 : Signalisation associée à ATF6.	53
Figure 15 : Mécanismes déclenchant la mort cellulaire au cours d'un stress du RE.....	57
Figure 16 : Physiopathologie associées aux mutations initiatrices des SMP et fréquence au cours des différentes maladies	75
Figure 17 : Représentation schématique de la séquence peptidique des 2 mutations de <i>CALR</i> les plus fréquentes.....	80
Figure 18 : Séquence peptidique de certaines mutations de <i>CALR</i>	81

Figure 19 : Comparaison des charges alléliques <i>CALR</i> déterminées à partir d'ADN et d'ARN	110
Figure 20 : Comparaison des charges alléliques des mutants <i>CALR</i> déterminées à partir d'ADN et d'ARN	111
Figure 21 : Comparaison des charges alléliques des mutants <i>CALR</i> déterminées sur ADN de polynucléaires neutrophiles et ARN plaquettaires.....	152
Figure 22 : La co-expression de MPL ne stabilise pas les formes mutantes de <i>CALR</i>	153
Figure 23 : Effet de la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562 sur l'expression de protéines mutantes <i>CALR</i>	154
Figure 24 : Niveaux d'expression des ARNm des formes mutées de <i>CALR</i> (type 1 et type 2) déterminés par PCR digitale après traitement des cellules par PMA ou DMSO.....	155
Figure 25 : Expression des formes mutées de <i>CALR</i> après différenciation de cellules primaires CD34 ⁺ vers différents lignages.	156

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	22
I. CONTROLE QUALITE DES PROTEINES SECRETEES ET STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE.....	22
1. <i>Synthèse des glycoprotéines et modifications co- et post-traductionnelles</i>	23
A. Clivage du peptide signal	23
B. N-Glycosylation	24
2. <i>Repliement des protéines : acteurs, contrôle qualité et export des glycoprotéines</i> ..	26
A. Les chaperonnes classiques	27
a. <i>Immunoglobulin Binding Protein - BiP</i>	27
b. <i>Glucose related Protein of 94 kDa - GRP94</i>	28
B. Les chaperonnes liant les motifs glycosylés.....	28
a. <i>Malectine</i>	28
b. <i>Le cycle calnexine/calréticuline</i>	29
C. Les enzymes participant au repliement : les foldases	32
a. <i>Oxydoréductases</i>	32
b. <i>Peptidyl Prolyl Isomerases</i>	33
D. <i>L'export des glycoprotéines correctement conformées</i>	33
3. <i>ERAD</i>	34
A. <i>ERAD des glycoprotéines</i>	35
a. <i>Le premier signal de destruction : la coupure des mannoses</i>	35
· <i>Mannosidases du RE</i>	35
o <i>ER α 1,2 mannosidase I (ERManI)</i>	36
o <i>Protéines de la famille EDEM</i>	37
· <i>Implication des mannosidases du Golgi :</i>	40
b. <i>Les lectines OS-9 et XTP3-B</i>	41
c. <i>La machinerie de rétro-translocation</i>	42
B. <i>L'ERAD des protéines non-glycosylées</i>	44
4. <i>Compartimentalisation du réticulum endoplasmique</i>	45
5. <i>Une alternative à la voie ERAD-protéasome, l'autophagie</i>	47
A. <i>Généralités sur l'autophagie</i>	47
B. <i>Rôle de l'autophagie dans le contrôle qualité des protéines sécrétées</i>	48
6. <i>Le stress du réticulum endoplasmique</i>	49
A. <i>Stress du RE et Unfolded Protein Response</i>	49
a. <i>Les voies de signalisation de l'UPR</i>	49
· <i>Inositol Requiring kinase 1 (IRE1)</i>	50
· <i>Double-stranded RNA-activated Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK)</i>	51
· <i>ATF6</i>	53
b. <i>Conséquences de l'activation de l'UPR</i>	54
· <i>Réduction du flux entrant de protéines dans le RE</i>	54
· <i>Augmentation des capacités chaperonnes et dégradation des protéines anormales</i>	55
· <i>En cas d'échec, une seule issue possible : la mort par apoptose</i>	56
B. <i>Stress du RE, cancers et hémopathies</i>	58
II. LES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS	61
1. <i>Hématopoïèse, mégacaryopoïèse</i>	61

A. Généralités sur l'hématopoïèse.....	61
B. Mégacaryopoïèse	62
2. <i>Les Syndromes Myéloprolifératifs</i>	63
A. Présentation clinico-biologique :	63
a. Leucémie Myéloïde Chronique.....	64
b. Polyglobulie de Vaquez	65
c. Thrombocytémie Essentielle.....	66
d. Myélofibrose Primitive	66
B. Physiopathologie :	69
a. Anomalies cytogénétiques	69
b. Anomalies moléculaires.....	70
· JAK2V617F.....	70
· JAK2 exon 12 :	72
· MPL exon 10 :	73
· Autres mutations de JAK2 et de MPL :	74
· Autres mutations :	76
c. Prédisposition aux SMP	76
III. UN NOUVEL ACTEUR DANS LES SMP, LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE.....	78
1. <i>Calréticuline et hémopathies non-SMP</i>	78
2. <i>Les mutations de calréticuline dans les SMP</i> :	79
A. Fréquence	79
B. Particularités clinico-biologiques et pronostic	82
3. <i>Éléments de physiopathologie</i>	86
A. Calréticulines mutées : des lectines anormales	86
B. Autres hypothèses.....	89
a. Impact sur la signalisation calcique	89
b. Rôle paracrine	89
c. Phagocytose	90
4. <i>Recherche des mutations de CALR et quantification des charges alléliques</i>	90
A. Intérêt de la quantification des charges alléliques dans les SMP : l'expérience JAK2V617F	90
B. Techniques de détection des mutations de CALR.....	91
C. Etude des charges alléliques CALR et corrélations clinico-biologiques.....	92
OBJECTIFS	96
ARTICLES ET TRAVAUX.....	100
I. ARTICLE 1	100
1. <i>Synthèse de l'article</i>	101
2. <i>Résultats complémentaires</i>	110
II. ARTICLE 2.....	113
1. <i>Synthèse de l'article</i>	114
2. <i>Résultats complémentaires</i>	151
DISCUSSION	160
I. DISCUSSION DE L'ARTICLE 1	160
II. DISCUSSION DE L'ARTICLE 2	163
CONCLUSION	172
BIBLIOGRAPHIE.....	176

ABBREVIATIONS

ADP : Adénosine Di-Phosphate	eIF : <i>eukaryote translation Initiation Factor</i>
ASXL1 : <i>Additional Sex Polycomb-Like 1</i>	ERGIC : <i>Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment</i>
ATF6 : <i>Activating Transcription Factor 6</i>	ERManI : <i>Endoplasmic Reticulum α 1,2 mannosidase I</i>
ATF4 : <i>Activating Transcription Factor 4</i>	ERQC : <i>Endoplasmic Reticulum Quality control Compartment</i>
ATG : <i>Autophagy related Gene</i>	ERdj : <i>Endoplasmic Reticulum resident protein</i>
ATP : Adénosine Tri-Phosphate	EPO : <i>Erythropoïétine</i>
ATRA : <i>Acide Tout-Trans Rétinoïque</i>	ERES : <i>Endoplasmic reticulum Exit Sites</i>
Asn : <i>Asparagine</i>	ERp57 : <i>Endoplasmic Reticulum protein of 57 kDa</i>
BiP : <i>Immunoglobulin heavy chain-Binding Protein ou Glucose-Regulated Proteins of 78kDa</i>	FERM : <i>band 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin</i>
CALR : <i>Calréticuline</i>	FKBP : <i>FK Binding Protein</i>
CAR : <i>CXCL12-abundant reticular</i>	GADD34 : <i>Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34</i>
CBL : <i>Casitas B-lineage Lymphoma</i>	G-CSF : <i>Granulocytes-Colony Stimulating Factor</i>
CHOP : <i>C/EBP-homologous protein</i>	GH47 : <i>Glycosyl Hydrolase 47</i>
CD : <i>Cluster of Differentiation</i>	GM-CSF : <i>Granulocytes-Monocytes-Colony Stimulating Factor</i>
CMA : <i>Chaperone Mediated Autophagy</i>	Gly : <i>Glycine</i>
CNX : <i>Calnexine</i>	GRP : <i>Glucose Related Protein</i>
CRISPR : <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	GSKIP : <i>GSK3β Interacting Protein</i>
Cys : <i>Cystéine</i>	
DR5 : <i>Death Receptor 5</i>	
EDEM : <i>Endoplasmic Reticulum Degradation Enhancing Mannosidase-like</i>	

HRD1: *HMG-coA Reductase Degradation 1*

HSP : *Heat Shock Protein*

IL : Interleukine

IRE1 : *inositol requiring kinase 1*

kDa : kilo-Dalton

KDEL : Lysine-Aspartate-Glutamate-Leucine

KO : *Knock Out*

LA : Leucémie Aiguë

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aiguë Myéloblastique

LAMP2A : *Lysosomal Associated Membrane Protein 2A*

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

MAM : *Mitochondria Associated ER Membran*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MECOM : *MDS1 and EVII Complex*

MFP : Myélofibrose Primitive

MIG : *Monokine induced by Gamma Interferon*

MIP : *Macrophage Inflammatory Protein*

MPL : Myeloproliferative Leukemia

MRH : *Mannose-6-phosphate Receptor Homology*

NBD : *Nucleotide Binding Domain*

NMD : *Non-sense Mediated Decay*

Nrf2 : *NFE2 Related Factor 2*

OS-9 : *Osteosarcoma amplified - 9*

OST : Oligosaccharyl Transferase

Pb : Paire de bases

PDGF : *Platelet Derived Growth Factor*

PDI : *Protein Disulfide Isomerase*

PERK : *double-stranded RNA-activated protein kinase -like endoplasmic reticulum kinase*

PI3K : Phosphoinositide-3 Kinase

PMA : Phorbol 12-Myrisate 13-Acetate

PML : Promyelocytic Leukemia

PP1 : *Protein Phosphatase 1*

PPIase : *Peptidyl Prolylisomerase*

PV : Polyglobulie de Vaquez

QCV : *Quality Control Vesicles*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

RARA : Récepteur Alpha à l'Acide Rétinoïque

RE : Réticulum Endoplasmique

RER : *Rough Endoplasmic Reticulum - Réticulum Endoplasmique Granuleux*

RIDD : *Regulated IRE1 Dependant Decay of mRNA*

S1P : *Site 1 Protease*

S2P : *Site 2 Protease*

SBD : *Substrate Binding Domain*

Ser : Serine

SMP : Syndrome Myéloprolifératif

SOCS : Suppressor of Cytokine Signaling

SRP : *Signal Recognition Particle*

STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TE : Thrombocytémie Essentielle

TERT : Telomerase Reverse Transcriptase

TET2 : Ten-Eleven Translocation

Thr : Thréonine

TPO : Thrombopoïétine

TPR : *Tetraico Peptide Repeat*

UGT1 : UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase

UPR : *Unfolded Protein Response*

Val : Valine

VCP : *Valosine Containing Protein*

VIP36 : *vesicular integral membrane protein of 36Kda*

VIPL : *VIP36-like*

XBP1 : *X-box Binding Protein 1*

XBP1s : *X-box Binding Protein 1 spliced*

Xxx : acide aminé quelconque excepté proline

AVANT-PROPOS

Les syndromes myéloprolifératifs sont des hémopathies malignes caractérisées par une prolifération cellulaire excessive sans blocage de la maturation. Longtemps considérées comme des « maladies des kinases », la découverte récente des mutations du gène codant la calréticuline (CALR) a pointé l'implication d'un compartiment cellulaire jusque là largement ignoré dans l'étude de la physiopathologie de ces maladies : le réticulum endoplasmique (RE). S'il a maintenant été démontré que ces mutations partageaient des mécanismes oncogéniques similaires à ceux associés aux autres mutations initiatrices de ces pathologies, la présentation clinique particulière des patients portant ces mutations ainsi que les données de transcriptomique obtenues chez ces patients laissent présager des particularités physiopathologiques qui leur sont propres.

Fort de notre expertise dans l'étude des syndromes myéloprolifératifs depuis les aspects translationnels jusqu'à l'étude plus fondamentale des mécanismes oncogéniques, nous avons souhaité apporter notre contribution à la caractérisation des mutations de CALR. La première pierre que nous avons souhaité apporter à l'édifice se pose sur un versant très appliqué à la clinique. Elle consiste en le développement d'un outil de quantification des charges mutationnelles (ou charges alléliques). Ce paramètre consiste à évaluer la proportion de copies mutées d'un gène dans un échantillon donné, permettant ainsi d'estimer la fréquence des cellules portant l'anomalie. En ce qui concerne la mutation *JAK2V617F*, la charge allélique a précédemment été corrélée à différents aspects de la maladie (présentation au diagnostic, évaluation pronostique). La détermination des charges mutationnelles constitue également un outil précieux pour le suivi thérapeutique des patients.

D'autre part, nous avons souhaité aborder la problématique des mécanismes oncogéniques associés à ces mutations d'un point de vue original en nous appuyant sur l'expertise du Dr Eric Chevet, présent à Bordeaux au début de ce travail. Initialement axé sur la description de l'impact des mutations de CALR sur l'homéostasie du RE et la sécrétion des glycoprotéines, nous avons réorienter notre projet afin de déterminer les raisons des faibles niveaux d'expression des protéines CALR mutantes. Ces aspects encore mal définis à ce jour nous semblent en effet importants pour décrire précisément les mécanismes conduisant à l'hyperprolifération associée à ces mutations, mais également pour envisager une approche thérapeutique ciblée et innovante.

Afin d'appréhender ces différents points, les différentes étapes importantes dans la maturation des glycoprotéines et les principales étapes du système de contrôle qualité des glycoprotéines seront exposées. Nous aborderons ensuite les conséquences de la mise en défaut de système conduisant à la situation dénommée stress du RE. Après de brefs notions sur l'hématopoïèse et la mégacaryopoïèse, les grandes notions concernant la physiopathologie des syndromes myéloprolifératifs seront exposées avant de nous concentrer sur les données actuellement disponibles sur les mutations de CALR.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Contrôle qualité des protéines sécrétées et stress du réticulum endoplasmique

La voie de sécrétion constitue un réseau de structures membranaires impliqué dans la production des protéines destinées à être exportées dans le milieu extracellulaire, à la membrane ou vers les différents organites. C'est au niveau de ces structures qu'elles sont synthétisées et acquièrent leur structure fonctionnelle. La voie de sécrétion comprend différentes organelles, notamment le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Chez les eucaryotes environ un tiers du protéome est ciblé vers la voie de sécrétion (Huh et al., 2003).

Chaque protéine est définie par sa séquence en acides aminés. Cependant pour être biologiquement active, il lui faut acquérir une structure tridimensionnelle bien définie. Globalement l'acquisition de cette conformation consiste à enfouir les régions hydrophobes au cœur de la protéine et n'exposer que les régions hydrophiles à la surface. Ce processus de repliement se réalise au niveau du RE qui constitue un compartiment cellulaire spécifique doté de la machinerie nécessaire à cette fonction (protéines charperonnes et enzymes diverses). Au cours de leur transit dans ce compartiment, les protéines en formation vont subir différentes modifications nécessaires à l'acquisition d'une conformation correcte et donc à leur activité biologique. Par ailleurs, du fait de la toxicité potentielle des protéines mal conformées, un système élaboré de contrôle qualité garantit la conformité de structure des protéines synthétisées dans le RE. Ainsi, si la maturation réussit, la protéine pourra être exportée vers sa destination finale. Si la conformation spatiale n'est pas adéquate, la protéine sera retenue dans le RE pour poursuivre sa maturation. Enfin, si l'acquisition de la conformation correcte échoue ou prend trop de temps, la protéine aberrante sera extraite du RE pour être dégradée par le protéasome. Ce système dénommé ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) garantit que seules les protéines fonctionnelles seront transportées vers leur destination finale via la voie de sécrétion. (Figure 1, Braakman and Hebert, 2013; Ellgaard and Helenius, 2003; Helenius and Aebi, 2004; Lamriben et al., 2016; Olivari and Molinari, 2007; Słomińska-Wojewódzka and Sandvig, 2015; Xu and Ng, 2015)

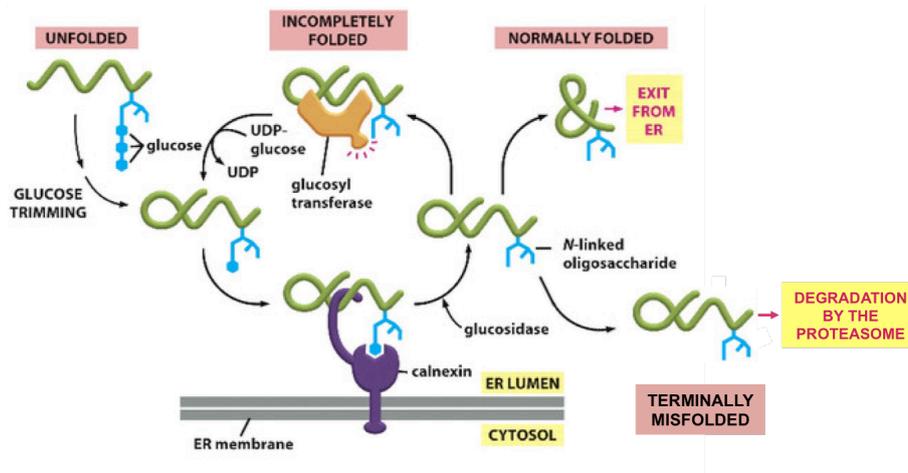


Figure 1 Principe du système de contrôle qualité des glycoprotéines sécrétées.

Les glycoprotéines en formation doivent acquérir une conformation spatiale adéquate pour pouvoir être sécrétées ou exprimées à la membrane. Tant que cette conformation n'est pas obtenue, elles sont retenues dans le réticulum endoplasmique afin de favoriser leur repliement correct. Si cette conformation ne peut être obtenue, les protéines sont exportées dans le cytosol pour être dégradées par le protéasome. (adapté d'après *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter, New York: Garland Science; 2002).

1. Synthèse des glycoprotéines et modifications co- et post-traductionnelles

Depuis leur entrée dans le RE et jusqu'à leur export, les protéines néo-synthétisées entrant dans la voie de sécrétion peuvent subir diverses modifications (clivage du peptide signal, formation de ponts disulfures, ADP-ribosylation, addition d'ancres glycosylphosphatidylinositol, O-mannosylation, N-glycosylation) qui interviennent dans le processus de repliement qui leur permettra de pouvoir exercer leurs activités biologiques. (Figure 2) Ces modifications peuvent également permettre de marquer leur état de maturation et ainsi au système de contrôle qualité de juger si elles peuvent être exportées ou si elles doivent être dégradées. (Braakman and Hebert, 2013)

A. Clivage du peptide signal

Les chaînes polypeptidiques naissantes entrent dans le RE par un canal formé dans la membrane du RE : le complexe translocon Sec61. (Park and Rapoport, 2012) Contrairement aux pores nucléaires, il s'agit d'un canal étroit nécessitant que les protéines soient totalement

dépliées pour pouvoir y passer. Classiquement, l'adressage des complexes ribosome-polypeptide vers le RE est assuré par la reconnaissance par la Signal Recognition Particule (SRP) d'une séquence en position N-terminale, le peptide signal. (Walter and Blobel, 1981) Composé d'environ 25 acides aminés, il permet de positionner le peptide pendant la traduction de telle sorte que la chaîne polypeptidique est poussée dans le RE au cours de sa synthèse. Très rapidement, le complexe signal peptidase va cliver cette séquence, généralement au cours de la traduction. (Hegde and Bernstein, 2006)

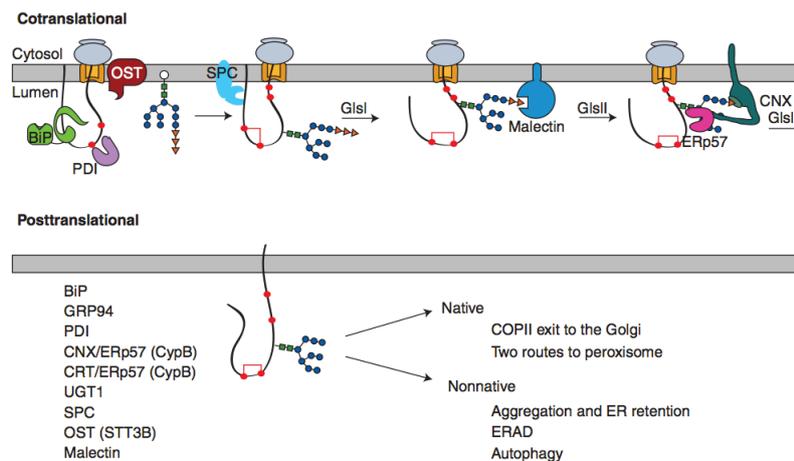


Figure 2 : Modification co- et post-traductionnelles apportées aux protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique.

Après avoir pénétré dans le RE, les protéines néosynthétisées subissent différentes modifications pouvant participer à leur maturation correcte. Parmi ces transformations, on peut retenir le clivage du peptide signal par le complexe Signal Peptidase (SPC) et l'ajout de motifs N-glycosylés par l'oligosaccharide transferase (OST). Ces chaînes glucidiques constituent une marque dont l'édition (par des glucosidases – Gls - et mannosidases) permettra par la suite de recruter les acteurs favorisant leur repliement correct *via* leur interaction avec des lectines comme la calnexine (CNX) ou la calréticuline (CALR). Ces motifs glycans permettent également d'évaluer leur état de maturation. (Braakman and Hebert, 2013)

B. N-Glycosylation

La plupart des protéines traversant la voie de sécrétion est modifiée par l'ajout de chaînes glycosylées sur les résidus Asn appartenant à la séquence consensus Asn-Xxx-Ser/Thr, ou plus rarement Asn-Xxx-Cys, Asn-Xxx-Val, Asn-Gly. (Xxx désignant n'importe quel acide aminé, Helenius and Aebi, 2004; Zielinska et al., 2010) Ce processus est dénommé N-glycosylation. Il se fait par le transfert en bloc d'un oligosaccharide composé de 2 N-

acétyl-glucosamines, 9 mannoses et 3 glucoses organisés en 3 branches (A, B et C, Figure 3) abrégé selon la formule Glc3Man9GlcNAc2. (Helenius and Aebi, 2004)

L'addition de ces chaînes est réalisée par le complexe oligosaccharyl transferase (OST) associé au translocon et se fait le plus souvent de manière co-traductionnelle (elle implique alors la sous-unité STT3A du complexe OST). (Nilsson and von Heijne, 1993) Une autre sous-unité de OST (STT3B) est capable de réaliser ce transfert de manière post-traductionnelle afin de rattraper les « oublis » de glycosylation, généralement pour des résidus en position C-terminal. (Ruiz-Canada et al., 2009)

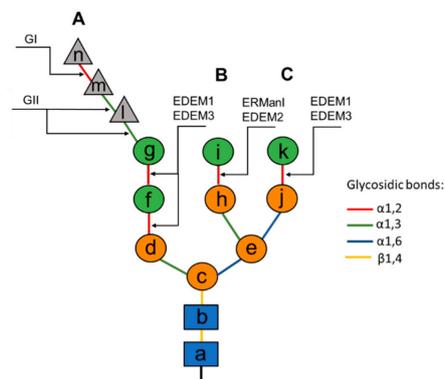


Figure 3 : Structure du motif glycosylé transféré sur les résidus asparagine des glycoprotéines dans le cadre de la N-glycosylation.

Les triangles gris correspondent aux glucoses, les ronds verts et oranges aux mannoses (la couleur dépendant du type de liaison comme indiqué sur le schéma) et les rectangles bleus aux N-acétyl-glucosamines (Słomińska-Wojewódzka and Sandvig, 2015)

La N-glycosylation a différents buts. Tout d'abord, elle permet d'augmenter la solubilité des chaînes néo-synthétisées encore non structurées. Par ailleurs, en modifiant les propriétés physiques des chaînes poly-peptidiques, les chaînes saccharidiques interviennent directement dans le repliement des protéines en améliorant la cinétique et la thermodynamique de repliement. (Hanson et al., 2009; Jitsuhara et al., 2002) Elles peuvent également masquer des régions hydrophobes, des sites de clivage ou de reconnaissance immunologique. Ces chaînes permettent de plus le recrutement de protéines chaperonnes et de facteurs de repliement (foldases), facilitant encore l'acquisition d'une conformation tridimensionnelle correcte. Enfin, ces chaînes glycosylées constituent une sorte de minuteur signalant lorsque la durée du programme de repliement a expiré et que la protéine doit être dégradée. (Braakman and Hebert, 2013; Helenius and Aebi, 2004; Olivari and Molinari,

2007)

D'autres modes de glycosylation ont été décrits. Les résidus Ser et Thr des protéines peuvent ainsi être modifiés par l'ajout de fucose, glucose, mannose et N-acétylglucosamine. Ces modifications ne sont cependant pas réalisées dans le RE et ne sont pas impliquées dans le contrôle qualité des glycoprotéines chez les eucaryotes supérieurs, (Xu and Ng, 2015) c'est pourquoi nous ne les détaillerons pas ici.

2. Repliement des protéines : acteurs, contrôle qualité et export des glycoprotéines

Du fait de la très forte concentration en protéines dans le RE, les chaînes peptidiques naissantes sont vulnérables au mauvais repliement et à l'agrégation. Ainsi, dès leur arrivée dans le RE, les chaînes polypeptidiques vont disposer d'un « comité de bienvenue » formé de différentes chaperonnes et d'enzymes de repliement (foldases) dont l'action permettra de fournir un environnement protégé et privilégié à l'intérieur de la cellule afin de favoriser leur bonne maturation. (Helenius and Aebi, 2004) Malgré cela, la proportion de protéines efficacement repliées peut parfois être très faible (30%). (Braakman and Hebert, 2013)

Les chaperonnes moléculaires sont définies comme des protéines aidant les autres protéines à acquérir leur conformation correcte, sans faire partie de la protéine finale. (Ellis and van der Vies, 1991) Deux systèmes principaux de chaperonnes existent dans le RE : les chaperonnes classiques et les chaperonnes liant les carbohydrates ou lectines. A côté de ces protéines chaperonnes, l'action d'enzymes catalysant la formation des ponts disulfures ou l'isomérisation cis-trans des prolines est également capitale pour le bon repliement des protéines. (Braakman and Hebert, 2013) Le rôle de ces différents acteurs est de retenir les chaînes polypeptidiques en formation dans l'environnement favorable au repliement qu'est le RE, de protéger les régions non repliées des protéines environnantes afin d'éviter l'agrégation des chaînes peptidiques, et d'assister les étapes limitantes du processus de repliement. (Olivari and Molinari, 2007)

A. *Les chaperonnes classiques*

Le RE contient des protéines des familles HSP70 et HSP90. Ces chaperonnes reconnaissent des substrats présentant à leur surface des régions hydrophobes qui devraient être enfouies au cœur de la protéine, signifiant qu'il s'agit d'intermédiaires de repliement, de protéines mal conformées ou de sous-unités non assemblées d'un multimère. Elles sont recrutées pour assister le repliement des protéines non-glycosylées ou des domaines de glycoprotéines non modifiés et éviter leur agrégation. Leur liaison dépend de la liaison de nucléotides-adénine et de l'action de co-facteurs spécifiques. (Braakman and Hebert, 2013; Lamriben et al., 2016)

a. *Immunoglobulin Binding Protein - BiP*

La famille HSP70 est principalement représentée dans le RE par BiP (Immunoglobulin Heavy Chain Binding protein) encore appelée Glucose Related Protein of 78 kDa (GRP78) ou Heat Shock 70 kDa Protein 5 (HSPA5). BiP comporte deux domaines : l'un pour lier les nucléotides (Nucleotide Binding Domain, NBD), l'autre pour lier les substrats (Substrate Binding Domain, SBD). La reconnaissance de ses substrats par BiP se fait par la liaison aux motifs hydrophobes exposés à leur surface. Le SBD se présente sous forme d'un sillon dont l'accès est contrôlé par un « couvercle ». La liaison de BiP à l'ATP ouvre ce couvercle tandis que l'hydrolyse de l'ATP en ADP le referme sur le substrat, protégeant ce dernier d'un repliement trop précoce ou d'une agrégation. Différents cofacteurs régulent le cycle de liaison de BiP à ses substrats. Chez les mammifères, BAP et GRP170 concourent à l'échange ADP-ATP. (Chung et al., 2002; Weitzmann et al., 2006) Au contraire, l'hydrolyse de l'ATP par BiP est accélérée par les membres de la famille HSP40 ou protéines du RE à domaine J (ERdj). Chez les mammifères, 7 protéines à domaine-J sont décrites (ERdj 1 à 7) assistant diverses fonctions de BiP. ERdj 1 et 2 sont associées au translocon et participent au positionnement de BiP à ce niveau pour assurer la maturation précoce des chaînes polypeptidiques en formation. ERdj3 et 6 se lient aux protéines en formation ou incomplètement conformées suggérant leur rôle dans le processus de repliement des protéines. ERdj4 et ERdj5 se lient aux protéines mal conformées et participent à l'accélération de leur dégradation. Le rôle de ERdj7 reste mal connu. (Otero et al., 2010) On considère que BiP est un régulateur majeur de l'homéostasie protéique du réticulum, se liant aux intermédiaires de repliement de la majorité des protéines traversant ce compartiment cellulaire. (Braakman and

Hebert, 2013)

b. Glucose related Protein of 94 kDa - GRP94

GRP94 est organisée en 3 domaines : N-terminal, médian et C-terminal. Elle peut lier les nucléotides adénylés par son domaine N-terminal. Comme BiP, la liaison de ces nucléotides conditionne l'ouverture ou la fermeture de la protéine chaperonne. Un motif KDEL en position C-terminale assure la rétention de la chaperonne dans le RE. Le site de liaison aux substrats de GRP94 reste inconnu. Bien que très abondante dans le RE, peu de clients de GRP94 ont été identifiés. Il n'a pas été identifié de co-chaperonne. (Braakman and Hebert, 2013) Par contre GRP94 semble être un acteur important pour cibler certains substrats vers la dégradation par l'ERAD. (Christianson et al., 2008)

B. Les chaperonnes liant les motifs glycosylés

Rapidement après leur liaison, les motifs N-glycosylés sont édités dans le RE pour être « reconstruits » ultérieurement dans l'appareil de Golgi. La composition de ce motif glycosylé est une sorte de marque reflétant le statut et l'âge de la protéine à laquelle il est attaché. Ce « glyco-code » est centré sur un système de lectine-chaperonnes : la calnexine et la calréticuline, spécifiques des motifs mono-glycosylés.

a. Malectine

Quasiment dès leur transfert sur les chaînes polypeptidiques, les chaînes N-glycosylées se voient amputées du 1er glucose de leur branche A par la glucosidase I (glucose n sur la Figure 3, Chen et al., 1995) Le motif Glc2Man9GlcNAc2 qui en résulte est la cible spécifique d'une lectine présente dans le RE : la malectine. (Schallus et al., 2008) Le motif diglycosylé étant présent à des étapes précoces, cela suggère une intervention de la malectine dans les premières étapes de la maturation des glycoprotéines. Cependant, il a été démontré que la malectine pouvait se lier à des substrats aberrants, ce qui laisse ouverte la question du mécanisme de distinction entre protéines en cours de repliement effectif et protéines aberrantes à ces stades très précoces. (Chen et al., 2011; Galli et al., 2011)

b. Le cycle calnexine/calréticuline

La coupure du 2^{ème} glucose (glucose m sur la Figure 3) par la glucosidase II se fait plus tardivement, mais peut survenir avant même que la chaîne peptidique ne soit finie de synthétiser. (Deprez et al., 2005; Lamriben et al., 2016; Olivari and Molinari, 2007) Le motif Glc1Man9NAcGlc2 ainsi formé est essentiel pour l'entrée des glycoprotéines dans le système chaperon calnexine/calréticuline-ERp57. (Olivari and Molinari, 2007)

La calnexine, protéine transmembranaire et la calréticuline, son homologue soluble, partagent une même structure générale. Elles sont constituées de 3 domaines (Figure 4) :

- un domaine N globulaire présentant un site unique de liaison aux motifs glycosylés, avec une spécificité pour les chaînes mono-glucosylées. (Hebert et al., 1995; Peterson et al., 1995) Cette association se fait avec une faible affinité, et donc de manière transitoire. Par ailleurs, il existe au niveau de ce domaine des sites de liaison pour l'ATP et pour le calcium. (Schrag et al., 2001; Wijeyesakere et al., 2011) La liaison de ces deux facteurs module l'interaction des lectines avec leurs substrats.
- un domaine central riche en prolines. Celui-ci crée un bras qui s'étend au-dessus de la chaperonne. Ce domaine permet une interaction avec l'oxydoréductase ERp57, de la superfamille PDI (Protein Disulfide Isomerase) ainsi qu'avec la cyclophiline B (voir plus loin). Dans le cas de la calréticuline, une liaison au calcium de faible capacité, mais de forte affinité se fait également au niveau de ce domaine. (Bedard et al., 2005; Michalak et al., 2009; Williams, 2006)
- un domaine C qui diffère entre les deux protéines, mais qui pour toutes les deux porte un motif de rétention dans le RE. Dans le cas de la calnexine, le domaine C comporte un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. Cette partie cytosolique porte un motif di-Arg ainsi que des résidus phosphorylables participant à la rétention dans le RE. (Chevet et al., 2010) Dans le cas de la calréticuline, le domaine C porte un motif KDEL de rétention dans le RE, ainsi qu'une série de résidus acides permettant une liaison de faible affinité mais avec une forte capacité pour le calcium. Ce domaine est naturellement non structuré et acquiert une conformation rigide suite à la liaison de calcium. (Villamil Giraldo et al., 2010)

Le nombre exact de substrats de ces deux lectines reste inconnu, mais on considère que toutes les glycoprotéines se lient à l'une et/ou l'autre de ces chaperonnes. Malgré de nombreuses similarités, il existe des différences dans le spectre des clients se liant à la calnexine et la calréticuline. (Molinari et al., 2004) Ces lectines seraient également capables de se lier à leurs substrats directement au niveau de certains segments peptidiques. (Danilczyk and Williams, 2001; Saito et al., 1999; Wijeyesakere et al., 2013)

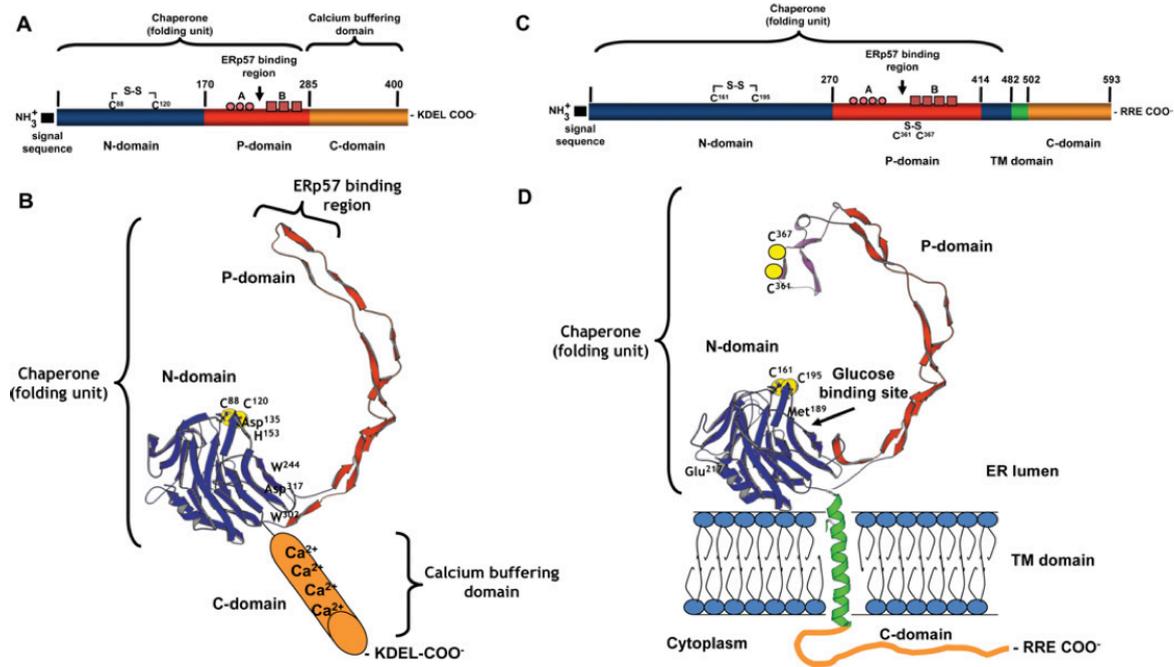


Figure 4 : Représentation schématique des structures linéaire et tridimensionnelle de la calréticuline et de la calnexine.

Les structures linéaire (haut) et tridimensionnelle (bas) de la calréticuline (gauche) et de la calnexine (droite) démontrent une organisation comparable des deux protéines. Celles-ci sont constituées de trois domaines (N, P et C) chacun impliqué dans une ou plusieurs fonction(s) de la protéine (chaperonne, liaison du calcium). (Michalak et al., 2009)

Comme évoqué précédemment, la calnexine et la calréticuline ont un rôle central dans le contrôle qualité des glycoprotéines. Elles favorisent le repliement des glycoprotéines de différentes manières :

- elles stabilisent les événements survenant dans le repliement ou ralentissent le processus de repliement de manière domaine-spécifique permettant ainsi de diriger le processus en contrôlant l'accessibilité des régions à structurer (Daniels et al., 2003;

Hebert et al., 1996, 1997).

- elles préviennent l'agrégation et la dégradation des intermédiaires de repliement (Hebert et al., 1996; Vassilakos et al., 1996).
- elles retiennent les intermédiaires de repliement dans le RE afin de leur offrir de nouvelles tentatives pour un repliement efficace (Rajagopalan et al., 1994). La rétention des intermédiaires ou protéines mal conformées dans le RE prévient également l'export de protéines non fonctionnelles.
- elles facilitent la formation de ponts disulfures grâce à leur association avec l'oxydoréductase ERp57 (Oliver et al., 1997; Zapun et al., 1998).
- elles favorisent l'isomérisation de prolines par une interaction avec la Peptidyl-Prolyl Isomerase Cyclophyline B (Kozlov et al., 2010).

D'autres fonctions leur ont également été attribuées. Notamment, la capacité de la calréticuline à lier de manière importante le calcium en fait un tampon calcique capital. Elle participe donc à la constitution d'une réserve de cet élément dans la RE et régule ainsi la signalisation et les processus dépendants du calcium. (Michalak et al., 2009)

La calréticuline intervient de plus dans divers processus, parmi lesquels l'immunité anti-cancéreuse : son expression à la surface des cellules constitue en effet un signal favorisant leur phagocytose. Son implication dans l'adhésion cellulaire, la réparation des tissus entre autres est également démontrée. (Bedard et al., 2005; Michalak et al., 2009)

Immédiatement après sa libération de la calnexine/calréticuline, la chaîne N-glycosylée verra son dernier glucose (glucose 1 sur la Figure 3) supprimé par l'action de la glucosidase II. La disparition de ce glucose a pour effet de supprimer la possibilité d'une ré-association avec les deux chaperonnes. La structure du glycopeptide est ensuite vérifiée par l'UDP-glucose:glycoprotein glycosyltransferase (UGT1 ou UGGT). Si sa conformation est correcte, le substrat sera ignoré et pourra être exporté vers sa destination finale. Si le client est reconnu comme trop mal conformé (de manière irrémédiable), il sera dévié vers la machinerie de dégradation pour être éliminé. Si toutefois le degré de mauvaise conformation est considéré comme modéré, l'UGT1 pourra re-glycosyler le mannose de la branche A du substrat qui pourra alors se lier de nouveau à la calnexine et/ou la calréticuline pour essayer

une fois de plus de se replier correctement. (Caramelo et al., 2003, 2004; Pearse et al., 2008; Ritter et al., 2005; Sousa and Parodi, 1995)

Si certaines protéines peuvent atteindre leur conformation native dès la première liaison à la calnexine/calréticuline (Soldà et al., 2007), d'autres doivent s'y associer et s'en dissocier plusieurs fois, réalisant des cycles de liaison-dissociation (Van Leeuwen and Kearse, 1997; Wada et al., 1997). Au sein de ce « cycle calnexine », UGT1 constitue un gardien primordial dans le système de contrôle qualité du RE, décidant si les glycoprotéines peuvent être exportées, ou si elles doivent y rester pour parfaire leur maturation. Pour cela, elle dispose d'un domaine « senseur de repliement » au niveau N-terminal reconnaissant les surfaces hydrophobes exposées. (Caramelo et al., 2003; Sousa and Parodi, 1995)

C. Les enzymes participant au repliement : les foldases

Pour assister les chaperonnes dans la maturation des protéines, le réticulum dispose d'enzymes dont les activités favorisent l'acquisition d'une conformation correcte à leurs substrats. Deux principales classes d'enzymes peuvent être retenues : les oxydoréductases et les Peptidyl Prolyl-isomérases.

a. Oxydoréductases

Plus de 20 oxydoréductases ont été identifiées, différant par leur potentiel redox, leur spécificité de substrats et leur profil d'expression dans les tissus. Protein Disulphide Isomerase (PDI) est la première oxydoréductase du RE découverte, mais également la plus abondante et la mieux caractérisée. Selon les conditions, elle catalyse la formation, l'isomérisation ou la réduction des ponts disulfures. Elle présente une spécificité de substrats très large (voire une absence de spécificité). Par ailleurs, elle présente la particularité de pouvoir se lier directement aux protéines par son domaine b'. (Braakman and Hebert, 2013; Ellgaard and Ruddock, 2005) Par ailleurs, l'entrée d'une glycoprotéine dans le cycle calnexine/calréticuline lui permet de recruter une oxydoréductase dédiée à son repliement : ERp57. (Ellgaard and Ruddock, 2005; Olivari and Molinari, 2007) ERp57 est elle aussi capable de se lier à des protéines via son domaine b', mais utilise cette propriété pour s'associer avec la calnexine et la calréticuline. (Frickel et al., 2002; Oliver et al., 1999)

Au cours de leur maturation, les cystéines d'une chaîne polypeptidique en formation

sont oxydées par les oxydoréductases pour former des ponts disulfures intramoléculaires. Ces ponts sont capitaux pour assurer la stabilité de la structure des protéines. En fait, il est probable que ces ponts ne guident pas directement le repliement des protéines, mais stabilisent les intermédiaires qui sont « sur la bonne voie », empêchant tout retour en arrière, et favorisant ainsi une maturation progressive vers la conformation adéquate. (Braakman and Hebert, 2013)

b. Peptidyl Prolyl Isomerases

La grande majorité des protéines comportent des résidus proline qui lorsqu'ils sont ajoutés sont dans une conformation trans. Ces résidus peuvent être transformés pour acquérir une conformation cis, réaction catalysée par les Peptidyl Prolyl Isomerases ou PPIase. Il s'agit d'un processus lent, constituant une étape limitant le repliement des protéines. Deux familles de PPIase sont distinguées : les cyclophilines et les protéines FK-binding protein (FKBP). (Braakman and Hebert, 2013) La cyclophiline B interagit avec le domaine P de la calnexine et de la calréticuline, partageant le site de liaison de ERp57. (Kozlov et al., 2010)

D. L'export des glycoprotéines correctement conformées

En plus des chaperonnes participant à la maturation des glycoprotéines dans le RE, d'autres lectines sont impliquées dans la liaison des glycoprotéines une fois que celles-ci ont acquis leur conformation définitive afin de permettre leur export vers leur destination.

ERGIC53 (Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment) est une protéine transmembranaire qui circule entre le RE et l'appareil de Golgi. (Appenzeller et al., 1999; Vollenweider et al., 1998) Elle se lie aux motifs glycanes avec une faible spécificité (y compris s'ils sont encore glucosylés), dans la mesure où leur contenu en mannose est suffisant. Elle ne reconnaît donc pas les chaînes Man5-6GlcNAc2 associées aux substrats destinés à être dégradés (voir plus loin, Kamiya et al., 2008). Cette spécificité exclut donc les protéines aberrantes des sites de sortie du RE (Endoplasmic reticulum Exit Sites – ERES). Des mutations d'ERGIC53 sont associées à un défaut de sécrétion de protéines, comme cela a été démontré pour les déficits combinés en facteurs V et VIII de la coagulation. (Nichols et al., 1998)

Deux autres lectines participent au trafic intracellulaire des glycoprotéines : VIP36 et

VIPL, qui comme ERGIC53 ne lie pas les motifs Man5-6GlcNAc2. (Satoh et al., 2014; Yamaguchi et al., 2007)

Les différentes étapes suivies par une glycoprotéine au sein de la voie de sécrétion sont résumées au niveau de la Figure 5. Celles-ci correspondent au cas où aucun échec n'est observé. Cependant, l'efficacité de maturation des glycoprotéines n'est pas absolue, et il peut arriver qu'une glycoprotéine n'arrive pas à atteindre sa conformation native. Afin de ne pas perturber les fonctions cellulaires, celle-ci doit alors être éliminée.

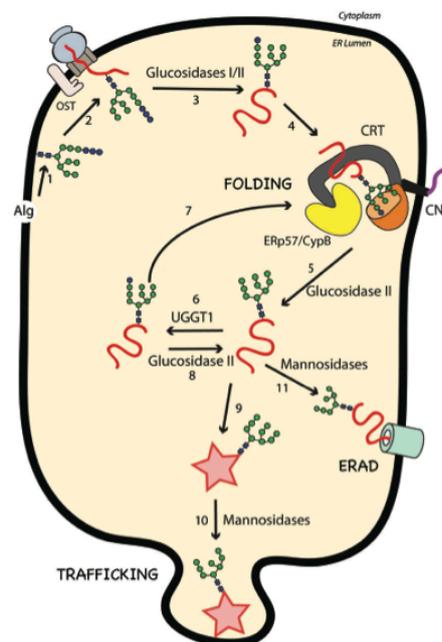


Figure 5 : Représentation schématique du devenir des glycoprotéines dans le RE depuis leur synthèse jusqu'à leur export ou leur dégradation.

Rapidement après leur entrée dans le RE, le peptide signal des protéines néo-synthétisées est clivé et des chaînes saccharidiques leur sont ajoutées. Ces chaînes N-glycosylées sont ensuite éditées par les glucosidases I et II. Les chaînes monoglucosylées qui en résultent constituent un motif permettant l'entrée dans le cycle calnexine/calréticuline, indispensable à l'acquisition d'une conformation spatiale correcte. Une fois convenablement repliée, la glycoprotéine peut être exportée. Cependant si celle-ci échoue à se replier correctement, elle sera orientée vers une dégradation par le système ERAD (Lamriben et al., 2016)

3. ERAD

Lorsqu'une protéine échoue à acquérir sa conformation fonctionnelle ou à s'oligomériser correctement, il est impératif qu'elle ne soit pas exportée vers sa destination

sous peine d'exercer des effets toxiques. Un système dédié permet ainsi de séquestrer ces protéines aberrantes dans le RE et de modifier les motifs glycosylés qu'elles portent afin de stopper les tentatives futiles de repliement et d'orienter ces substrats vers le protéasome. On parle d'ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated Degradation. (Helenius and Aebi, 2004; Olivari and Molinari, 2007)

A. ERAD des glycoprotéines

a. Le premier signal de destruction : la coupure des mannoses

- *Mannosidases du RE*

La reconnaissance des protéines comme mal conformées est délicate puisqu'il est nécessaire de les distinguer des intermédiaires de repliement qui présentent des caractéristiques similaires (exposition de régions hydrophobes par exemple), mais qui eux ne doivent pas être dégradés. Cette distinction semble basée sur le temps passé par la glycoprotéine dans le RE, la dégradation commençant typiquement après un délai de 30-90 minutes suivi d'une dégradation exponentielle. (Mancini et al., 2003; Molinari et al., 2003)

Les données montrant que la suppression des mannoses des chaînes glycosylées liés en $\alpha 1,2$ était requise pour l'évacuation des glycoprotéines du RE ont été publiées avant même qu'il ait été démontré que la dégradation était ensuite assurée par le protéasome. (Olivari and Molinari, 2007) La kifunensine et la 1-deoxymannojirimycine, des analogues de mannose, inhibent cette coupure des mannoses et ainsi s'opposent à la dégradation de la plupart si ce n'est de tous les substrats glycosylés. Ces composés ciblent les membres de la famille Glycosyl Hydrolase 47 (GH47) comprenant les mannosidases du RE : ER $\alpha 1,2$ mannosidase I (ERManI), et du Golgi : $\alpha 1,2$ mannosidase IA, IB et IC, ainsi que les 3 membres de la famille EDEM (Endoplasmic Reticulum degradation Enhancing Mannosidase-like). L'effet de la kifunensine et de la 1-deoxymannojirimycine a donc fait pressentir les membres de cette famille comme des acteurs importants de l'ERAD.

Contrairement aux levures, le déclenchement de la dégradation d'une glycoprotéine chez les mammifères ne nécessite pas seulement la coupure du mannose terminal de la branche B (mannose i dans la Figure 3). Il requiert également une démannosylation extensive

des motifs glycanes, exposant les mannoses liés en $\alpha 1,6$. (d et J sur la Figure 3, Avezov et al., 2008; Frenkel et al., 2003; Hosokawa et al., 2003; Kitzmüller et al., 2003) Par ailleurs, les chaînes qui en résultent (Man5GlcNAc2 ou Man6GlcNAc2) ne présentent plus le mannose terminal de la branche A (g sur la Figure 3) et ne peuvent donc plus être re-glycosylées par UGT1. L'activité de ces enzymes est faible, expliquant que le clivage ne survienne qu'après un délai pouvant excéder une heure dans les cellules de mammifères. Cette action lente constitue donc une sorte de minuteur. Le clivage des mannoses nécessite un certain délai et seules les protéines retenues dans le RE suffisamment longtemps se verront amputées de leurs mannoses, épargnant ainsi les protéines nouvellement synthétisées. Le délai dépend des protéines, notamment du nombre et de la position des motifs glycosylés, mais aussi d'autres facteurs. (Helenius and Aebi, 2004)

○ *ER α 1,2 mannosidase I (ERManI)*

ERManI est une protéine transmembranaire de type II résidente du RE, considérée depuis longtemps comme le minuteur initiant la dégradation des protéines aberrantes. (Figure 6, Gonzalez et al., 1999; Helenius and Aebi, 2004; Hosokawa et al., 2003; Tremblay and Herscovics, 1999) Pour jouer efficacement ce rôle, son niveau d'expression basal est faible assurant que le clivage des mannoses des motifs glycosylés est dépendant du temps passé dans le RE. (Wu et al., 2003)

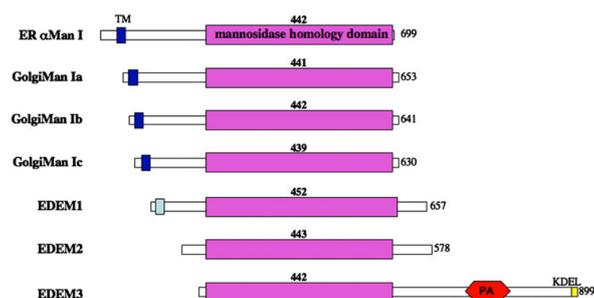


Figure 6 : Représentation schématique de la structure linéaire des membres de la famille Glycosyl Hydrolase 47.

Les différents membres partagent le domaine *mannosidase homology*. ERManI et les mannosidases du Golgi disposent d'un domaine transmembranaire (TM). Le peptide signal d'EDEM1 peut ne pas être coupé, à l'origine d'une protéine pouvant être transmembranaire ou soluble. Par rapport aux autres membres, EDEM3 dispose d'un domaine *Protease Associated* (PA) de fonction inconnue. (Olivari and Molinari, 2007)

On a longtemps considéré qu'ERManI ne clivait que le mannose terminal de la branche B (i sur la Figure 3). (Kitzmüller et al., 2003; Wu et al., 2003). Cependant, des études récentes ont montré que dans des conditions d'hyper-expression (ou hyper-concentration), cette mannosidase pouvait être impliquée dans une coupure plus extensive des mannoses des chaînes glycosylées. (Avezov et al., 2008; Benyair et al., 2015a) Compte tenu que son expression n'est pas induite par un stress du RE, ceci pourrait être obtenu au niveau de certains compartiments du RE (voir plus loin), ou via une interaction avec EDEM1 qui stabilise la protéine. (Termine et al., 2009)

- *Protéines de la famille EDEM*

Une autre explication au clivage extensif des mannoses des chaînes glycosylées des substrats de l'ERAD est l'implication d'autres protéines appartenant à la famille Endoplasmic Reticulum Degradation Enhancing Mannosidase-like ou EDEM.

EDEM1 a été identifiée chez la souris comme une cible induite par un stress du RE. (Hosokawa et al., 2001) Quelques années après, deux autres membres de la famille ont été découverts : EDEM2 et EDEM3. (Hirao et al., 2006; Mast et al., 2005; Olivari et al., 2005)

L'alignement des protéines EDEM entre elles et avec les autres membres de la famille GH47 révèle une conservation d'environ 440 acides aminés correspondant au domaine homologue aux mannosidases. En dehors de ce domaine, il existe peu d'homologie entre les différentes protéines. (Mast et al., 2005; Olivari et al., 2005)

Initialement décrite comme protéine transmembranaire de type II dans la lignée COS (Hosokawa et al., 2001), EDEM1 a été décrite dans des études ultérieures comme soluble. (Figure 6, Olivari et al., 2005) Ces discordances résultent d'une faible efficacité du clivage du peptide signal à l'origine de la génération de deux protéines de topologie différente. (Tamura et al., 2011) EDEM2 et EDEM3 sont quant à elles des protéines solubles. (Hirao et al., 2006; Mast et al., 2005; Olivari et al., 2005) EDEM3 diffère des autres membres par la présence d'un domaine associé aux protéases dont la fonction reste inconnue, ainsi que par la présence d'un motif de rétention dans le réticulum endoplasmique KDEL. EDEM1 et EDEM2 ne présentent aucune séquence de rétention dans le RE, suggérant que leur rétention dans ce compartiment passe par une interaction avec d'autres protéines résidentes. (Kanehara et al., 2007) EDEM1, 2 et 3 présentent respectivement 5, 4 et 7 sites de glycosylation. (Hirao et al.,

2006; Hosokawa et al., 2001; Mast et al., 2005; Olivari et al., 2005) L'expression des différents membres de cette famille est induite par un stress du RE via la voie IRE1-XBP1. (Olivari et al., 2005; Yoshida et al., 2003)

Ces protéines ont été impliquées dans la dégradation de différents substrats de l'ERAD, leur sur-expression accélérant la disparition des protéines aberrantes, leur extinction la ralentissant. Cependant, leur fonction exacte dans ce processus reste sujette à controverse.

Différentes études ont suggéré que ces protéines accélèrent la libération des substrats du cycle calnexine/calréticuline-ERp57 en vue de leur élimination de la lumière du RE. (Molinari et al., 2003; Oda et al., 2003)

Si tous les membres de la famille GH47 conservent les résidus nécessaires à l'activité catalytique mannosidase (et la liaison à la kifunensine) (Olivari and Molinari, 2007; Słomińska-Wojewódzka and Sandvig, 2015), les études initiales sur EDEM1 et EDEM2 ont échoué à identifier une activité mannosidase. (Hosokawa et al., 2001; Mast et al., 2005; Olivari et al., 2005) Il semblerait cependant que la sur-expression d'EDEM1 soit associée à la démannosylation de ses substrats au niveau des branches A et C. (Hosokawa et al., 2010; Olivari et al., 2006) L'activité catalytique d'EDEM3 a quant à elle été suggérée dès sa découverte. (Hirao et al., 2006) L'hypothèse selon laquelle EDEM1 et EDEM3 portent effectivement une activité catalytique concorde avec le fait que la mutation des résidus nécessaires à l'activité mannosidase prévient le clivage des mannoses de leurs substrats. (Cormier et al., 2009; Hosokawa et al., 2010; Olivari et al., 2006) Plus controversée, l'activité catalytique d'EDEM2 a récemment été pointée par des expériences de KO dans des lignées eucaryotes. (Ninagawa et al., 2014) Cette étude suggère une double vérification des substrats de l'ERAD dans les cellules de mammifères. EDEM2 serait le principal acteur responsable du clivage du mannose i de la branche B (avec un rôle prépondérant sur celui de ERManI) tandis qu'EDEM3 (et dans un moindre mesure EDEM1) participerait à la transformation des chaînes mannosylées conduisant aux motifs Man7GlcNAc2 (Figure 7). Cette démannosylation extensive exercée par les membres de la famille EDEM fournit ainsi différents signaux. Elle permet d'extraire définitivement les substrats du cycle calnexine/calréticuline, la suppression des mannoses empêchant UGT1 de reglucosyler ses cibles potentielles. Par ailleurs, l'exposition des mannoses liés en α 1,6 oriente les glycoprotéines vers les acteurs en aval dans la voie de l'ERAD. Cette démannosylation prévient également la liaison à ERGIC53 et s'oppose à l'export des protéines aberrantes. Néanmoins des études démontrant clairement

l'activité mannosidase des EDEM sur des protéines purifiées manquent encore.

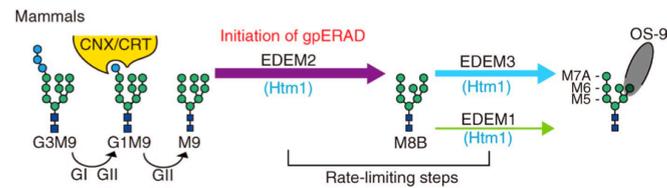


Figure 7 : Représentation schématique du clivage des mannoses des chaînes glycosylées intervenant dans l'initiation de l'ERAD.

Selon le modèle proposé par Ninagawa *et al.*, le clivage du 1^{er} mannose de la branche B est principalement médié par EDEM2 chez les mammifères. Le clivage plus extensif des mannoses est ensuite principalement réalisé par EDEM3 et dans une moindre mesure EDEM1. Sur le schéma, les ronds bleus représentent les glucoses, les ronds verts les mannoses et les carrés bleus foncés les N-acétylglucosamines. (Ninagawa *et al.*, 2014)

L'activité catalytique de ces protéines ne semble pas toujours indispensable pour exercer leurs fonctions dans l'ERAD. Par exemple, il a été démontré qu'EDEM1 s'oppose à la formation d'agrégats par les substrats libérés du cycle calnexine, sans que cette activité dépende de la démannosylation du substrat. (Hosokawa *et al.*, 2006; Olivari *et al.*, 2006; Ron *et al.*, 2011) De plus, la liaison au substrat d'EDEM1 et EDEM2 peut être indépendante des motifs glycosylés, et donc non connectée avec l'activité catalytique des EDEMs. (Cormier *et al.*, 2009; Groisman *et al.*, 2011; Marin *et al.*, 2012; Ron *et al.*, 2011; Slominska-Wojewodzka *et al.*, 2006; Sokołowska *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2014b) La mutation de résidus du site mannosidase d'EDEM1 n'inhibe pas l'accélération de dégradation de ses substrats. (Cormier *et al.*, 2009) Ainsi, les protéines de cette famille pourraient donc se comporter comme de simples chaperonnes. Leur rôle serait alors de reconnaître les protéines mal conformées pour les transmettre à des effecteurs en aval de la voie de l'ERAD. (Cormier *et al.*, 2009; Oda *et al.*, 2006; Saeed *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2014b) L'activité mannosidase serait alors portée par un autre facteur, par exemple ERManI dont l'expression est stabilisée par EDEM1. (Termine *et al.*, 2009) Il est également possible que les protéines EDEM exercent ces deux fonctions (mannosidase et chaperonnes) mais dans des conditions différentes : la 1^{ère} en conditions basales, la 2^{ème} dans des conditions de stress.

- *Implication des mannosidases du Golgi :*

Une implication des mannosidases du Golgi capables de cliver les mannoses de la branche A a également été considérée. (Hebert and Molinari, 2007) Ceci nécessiterait soit le transport de ces enzymes dans le RE, soit le transfert des substrats de l'ERAD dans le Golgi. Cette dernière hypothèse concorderait avec les observations d'un trafic subi par les substrats de l'ERAD à travers les compartiments golgiens. (Caldwell et al., 2001; Hammond and Helenius, 1994; Kincaid and Cooper, 2007) L'implication des mannosidases golgiennes a également été démontrée pour des mutants de l' α 1-antitrypsine. (Hosokawa et al., 2007) Mais le rôle de l'appareil de Golgi dans l'ERAD peut également être relié à ERManI. En effet, cette mannosidase a pu être localisée dans le Golgi où elle subit des O-glycosylations. Il a été suggéré que le marquage des substrats pour l'interaction avec ERManI pouvait se dérouler dans le Golgi. ERManI participerait à un système multifonctionnel facilitant le rapatriement des substrats de l'ERAD vers le RE. (Pan et al., 2011, 2013)

En définitif, la structure du motif de base de N-glycosylation est telle que la branche A fournit des informations quant à la maturation de la protéine (cycle calnexine), tandis que les branches B et C sont utilisées pour orienter le substrat vers l'ERAD (mannosidases et lectines de l'ERAD). Le clivage du glucose terminal de la branche A expose le 2^{ème} glucose qui inhibe la liaison aux lectines chaperonnes calnexine et calréticuline. Son clivage permet l'accès au 3^{ème} glucose qui lui est indispensable à l'entrée dans le cycle calnexine/calréticuline. D'un autre côté, le clivage du mannose terminal de la branche B permet l'exposition de la structure mannosylée ramifiée servant à initier l'ERAD. (Helenius and Aebi, 2004) Les différentes étapes de l'édition des motifs N-glycosylés sont résumées dans la Figure 8.

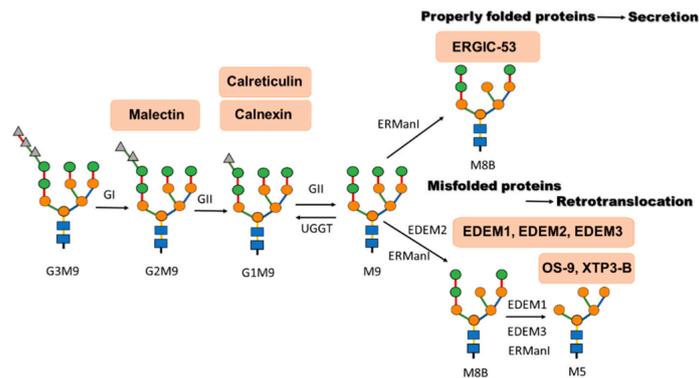


Figure 8 : Représentation schématique des modifications des motifs N-glycosylés.

Les triangles gris correspondent aux glucoses, les ronds verts et oranges aux mannoses et les rectangles bleus aux N-acétyl-glucosamines. Les glucoses sont successivement clivés par les glucosidase I et II, permettant l'association successive aux lectines du RE (malectine puis calnexine et calréticuline). La coupure des mannoses par les membres de la famille GH47 permet d'initier l'export des protéines qui ont acquis une conformation correcte, ou la dégradation des protéines qui échouent à se replier correctement. (Słomińska-Wojewódzka and Sandvig, 2015)

b. Les lectines OS-9 et XTP3-B

L'exposition de résidus mannoses « internes » permet le recrutement de lectines dont la fonction est de délivrer les substrats à la machinerie de rétro-translocation. Dans les cellules de mammifères, il s'agit de OS-9 (Osteosarcoma amplified-9) et XTP3-B. (Groisman et al., 2011; Hosokawa et al., 2009; Yamaguchi et al., 2010) Ces lectines reconnaissent via leur domaine Mannose-6-phosphate Receptor Homology (MRH) les substrats dont les mannoses de la branche C (liés en $\alpha 1,6$) ont été clivés (mannose j, e et c sur la Figure 3). Le clivage du mannose g (sur la branche A de la Figure 3), n'est pas requis pour que OS-9 puisse se lier à son substrat. (Hosokawa et al., 2009) Par cette spécificité, OS-9 et XTP3-B sont capables de reconnaître les protéines qui ont été reconnues comme aberrantes suite à leur passage dans le cycle calnexine/calréticuline. Leur rôle semble se limiter à celui d'intermédiaires dans la voie de l'ERAD : elle captent les substrats amenés par les mannosidases pour les transmettre à la machinerie de rétro-translocation afin de les extraire du RE, et plus particulièrement à l'adaptateur membranaire SEL1L. (Bernasconi et al., 2008; Christianson et al., 2008; Hosokawa et al., 2008, 2009)

c. La machinerie de rétro-translocation

Une fois identifiés, les substrats de l'ERAD sont dirigés vers une machinerie assurant leur rétro-translocation (ou dislocation, c'est-à-dire leur passage du RE vers le cytosol). Ce transfert est couplé à leur ubiquitination leur permettant, une fois dans le cytosol, d'être la cible du protéasome. L'ensemble de ces processus est réalisé par des complexes multiprotéiques centrés sur une ubiquitine-ligase. (Hampton and Sommer, 2012)

Les substrats acheminés par OS-9 et XTP3-B doivent dans un premier temps être transférés vers le complexe de rétro-translocation. Ceci est assuré par un adaptateur transmembranaire, SEL1L. (Mueller et al., 2008) Cet acteur dont la plus grande partie est localisée dans la lumière du RE comporte des domaines présentant des répétitions de tétraicoptides (TPR, répétitions de séquences de 34 acides aminés) permettant l'établissement d'interactions protéines-protéines. Ainsi, SEL1L interagit avec les autres membres des complexes de rétro-translocation, mais aussi avec OS-9, XTP3-B, EDEM1, calnexine, BiP, PDI. (Christianson et al., 2008; Cormier et al., 2009; Hosokawa et al., 2008; Mueller et al., 2008).

Le passage au travers la membrane du RE devrait en toute logique impliquer la formation d'un canal dont les constituants restent discutés. Les différents membres du complexe de rétro-translocation pourraient en fait participer à sa formation. Notamment, les protéines transmembranaires de la famille Derlin (Lilley and Ploegh, 2004; Oda et al., 2006; Ye et al., 2004) de par leur capacité à s'homo- et/ou s'hétéro-oligomériser pourraient ainsi participer à la formation d'un large canal permettant la dislocation des substrats de l'ERAD. (Lilley and Ploegh, 2005; Ye et al., 2005) Sec61 (impliqué dans le transport des protéines dans le RE) pourrait également intervenir dans l'extraction de certains substrats de l'ERAD du RE. (Xu and Ng, 2015) Quelle que soit la nature du canal, le substrat doit être maintenu dans une configuration permettant son passage par le pore (c'est-à-dire suffisamment déplié). Un rôle de ERdj5 dans ce processus a été suggéré, en participant à la réduction des ponts disulfures. (Ushioda et al., 2008)

Au cours de l'extraction des protéines aberrantes, celles-ci vont être ubiquitinées. Cette réaction peut être assurée par différentes ubiquitine-ligases dont la plus étudiée chez les mammifères est HRD1. (Kikkert et al., 2004) La liaison covalente d'ubiquitine sur les résidus de la protéine cible lui permettra d'être « prise en charge » par le protéasome afin d'être

dégradée. Cette marque participe également à sa reconnaissance par l'AAA+ ATPase p97 (ou Valosine Containing Protein, VCP). L'hydrolyse de l'ATP réalisée par p97 permet ainsi de fournir l'énergie nécessaire pour extraire le substrat du RE au travers du canal membranaire. (Ye et al., 2003)

Parmi les autres acteurs impliqués dans ces structures multiprotéiques, nous retiendrons également les protéines Herp, dont l'une des fonctions pourrait être d'assurer le recrutement des différents constituants du complexe vers HRD1 et SEL1L. (Huang et al., 2014; Leitman et al., 2014) Une représentation de la complexité de ces structures mutliprotéiques impliquées dans la rétro-translocation est présentée sur la Figure 9.

Une fois dans le cytosol, les protéines aberrantes seront dé-glycosylées par une N-glycanase (Zhao et al., 2007) avant d'être adressées au protéasome. Celui-ci va alors assurer leur dégradation. (Bhattacharyya et al., 2014; Voges et al., 1999)

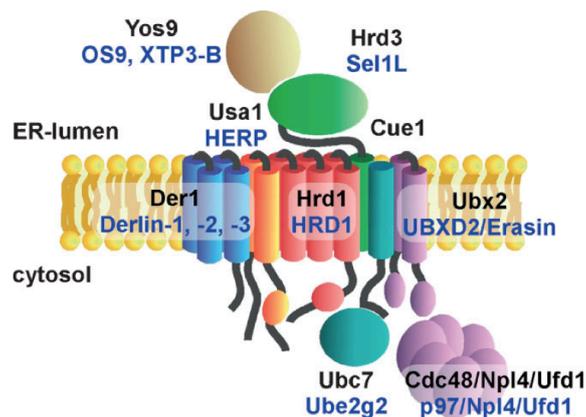


Figure 9 : Structure et composition du complexe de rétro-translocation impliqué dans la dégradation des protéines luminales du RE.

La dislocation des substrats de l'ERAD met en jeu des complexes protéiques assemblés autour d'une ubiquitine ligase, la plus étudiée chez les mammifères étant HRD1. Les protéines indiquées en noir correspondent aux membres du complexe identifiés chez la levure et celles en bleu désignent les orthologues identifiés chez les mammifères. (Mehnert et al., 2010)

B. L'ERAD des protéines non-glycosylées

Les mécanismes impliqués dans la dégradation des protéines, précédemment exposés, sont basés sur la liaison et l'édition des motifs glycosylés qu'elles portent. Aussi important que soit le motif glycosylé dans ce processus, il a été clairement démontré que l'interaction des différents acteurs de l'ERAD pouvait être indépendante de ce motif poly-saccharidique. Par exemple, les différents membres de la famille EDEM peuvent se lier à leurs substrats même en cas de mutation de leur site MRH (Cormier et al., 2009; Kosmaoglou et al., 2009; Marin et al., 2012; Ron et al., 2011) Même les protéines décrites comme des lectines « pures » peuvent être impliquées directement dans la reconnaissance de domaines protéiques mal conformés. (Hosokawa et al., 2009; Yamaguchi et al., 2010) La capacité d'EDEM1, EDEM2, EDEM3, Herp, HRD1, Derlin-1 ou p97 à lier des substrats totalement non-glycosylés est une autre preuve que la reconnaissance des protéines comme anormales ne passe pas entièrement par la structure des chaînes osidiques. (Groisman et al., 2011; Huang et al., 2014; Marin et al., 2012; Okuda-Shimizu and Hendershot, 2007; Tang et al., 2014) Comme pour les autres chaperonnes, cette reconnaissance passe par l'identification de régions hydrophobes anormalement exposées. (Sokołowska et al., 2015) Notons cependant que la liaison aux substrats non glycosylés n'est pas forcément associée à leur dégradation. (Tang et al., 2014b) De même, l'implication dans la dégradation d'une glycoprotéine n'est pas obligatoirement associée au même rôle pour la protéine non glycosylée. (Hirao et al., 2006; Hosokawa et al., 2001; Olivari et al., 2005; Tang et al., 2014b)

Bien qu'impliquant de nombreux acteurs en commun avec « l'ERAD classique », le système d'ERAD des protéines non glycosylées n'est cependant pas parfaitement superposable. Par exemple, Herp est important pour la dégradation des chaînes légères kappa. Or ces substrats non glycosylés sont pris en charge par BiP plutôt que par le système classique des lectines. (Okuda-Shimizu and Hendershot, 2007)

Un rôle accessoire de ce système a initialement été suggéré. Selon cette hypothèse l'ERAD « non glycosylé » n'aurait que peu d'importance à l'état basal. Par contre, lorsque des protéines aberrantes s'accumulent dans le RE, il renforcerait le nettoyage de ce compartiment assuré par l'ERAD des glycoprotéines, afin d'en rétablir l'homéostasie. (Ushioda et al., 2013) Cependant, des études plus récentes semblent indiquer une participation active de ce système dans la dégradation des substrats même dans des conditions basales.

(Ninagawa et al., 2015)

4. Compartimentalisation du réticulum endoplasmique

Bien que le RE constitue un organite unique et continu, il peut être divisé en différentes régions. On peut tout d'abord distinguer le RE granuleux périnucléaire « décoré » par les ribosomes et le RE lisse dépourvu de ribosomes, mais s'étendant plus largement dans les cellules. Ce RE lisse peut lui-même être subdivisé en différentes régions fonctionnelles (Figure 10). On peut ainsi distinguer l'Endoplasmic Reticulum Quality control Compartment ou ERQC, les Quality Control Vesicles ou QCV, ou les Endoplasmic Reticulum Exit Sites ou ERES (Figure 10).

Les protéines sont synthétisées au niveau du RE granuleux où les acteurs précoces (OST, complexe de clivage du peptide signal, glucosidases, BiP, calnexine et calréticuline) favorisent dès les premières étapes un environnement favorable à un repliement correct et défavorable à l'agrégation. (Braakman and Hebert, 2013) Les complexes calnexine/calréticuline-glycoprotéines clientes ainsi formés circulent ensuite en direction de l'ERQC afin de séparer les protéines non- ou incorrectement conformées des protéines naissantes. Les lectines chaperonnes permettent donc également de véhiculer leurs clients vers ce sous-compartiment du RE. (Benyair et al., 2015a)

Les protéines aberrantes vont ensuite circuler entre l'ERQC et les QCV pour entrer en contact avec ERManI où elle est constitutionnellement séquestrée. Au niveau de ces vésicules, les concentrations en enzymes peuvent être bien supérieures à celles retrouvées dans le reste du RE, conditions permettant à ERManI de cliver de manière extensive les mannoses des chaînes glycosylées. (Avezov et al., 2008; Benyair et al., 2015a) Les substrats qui résultent de cette activité sont ensuite piégés au niveau de l'ERQC par OS-9 et XTP3-B afin de permettre leur rétro-translocation et leur dégradation. (Groisman et al., 2011; Leitman et al., 2014)

Les protéines correctement conformées vont quant à elles être épargnées de ce clivage des mannoses et s'accumuler au niveau des ERES. Là, elles pourront se lier à ERGIC53 avant d'être exportées. La spécificité de cette lectine pour les chaînes ayant un contenu en mannose « élevé » exclut les substrats de l'ERAD des sites ERES. (Kamiya et al., 2008)

Cette compartimentalisation permet donc aux substrats de tenter d'acquérir leur

conformation correcte sans qu'il y ait de clivage des mannoses de manière concomitante. Ceci participe probablement également à la lenteur de clivage des mannoses précédemment évoquée et permettant de constituer un minuteur orientant les protéines vers la dégradation en cas de contact prolongé avec les lectines.

En cas d'inhibition de la dégradation des protéines aberrantes ou de la saturation de la machinerie de l'ERAD, les protéines mal conformées s'accumulent dans le RE, définissant un stress du RE. Celles-ci sont alors séquestrées au niveau de l'ERQC, conjointement avec la calnexine, la calréticuline, EDEM1 et ERManI. (Benyair et al., 2015a; Kondratyev et al., 2007) Dans ces situations, les QCV convergent vers l'ERQC (Benyair et al., 2015b) afin de favoriser un contact privilégié entre les mannosidases et leurs substrats afin d'accélérer l'édition des motifs glycosylés et la délivrance à la machinerie de dégradation.

A cela s'ajoute une compartimentalisation temporelle, les différents complexes de l'ERAD s'associant de manière transitoire, lorsque leur action est nécessaire. (Benyair et al., 2015a)

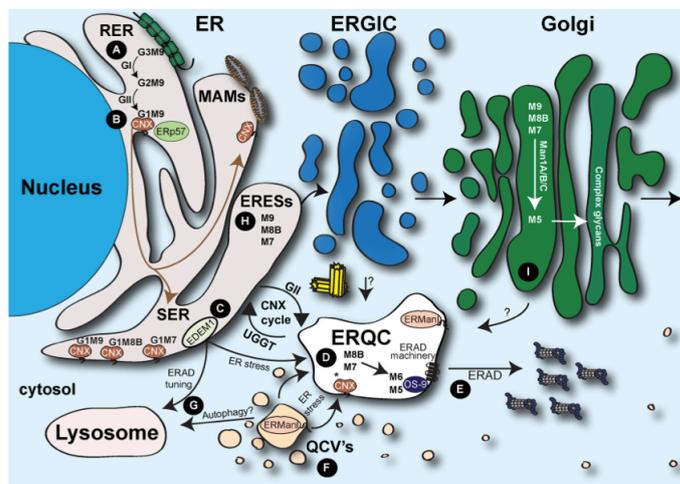


Figure 10 : Représentation schématique de la sous-compartimentalisation du RE.

Les protéines sont synthétisées au niveau du RE granuleux (RER) avant d'être transférées dans le RE lisse. Si elles acquièrent une conformation correcte, elles gagnent les sites de sortie du RE (ERES) pour être exportées vers leur destination *via* le Golgi. Les protéines anormales transitent entre le compartiment de contrôle qualité (ERQC) et les vésicules de contrôle qualité (QCV) pour subir la coupe des mannoses de leurs chaînes glycosylées, étape indispensable pour les orienter vers la dégradation par le protéasome. (Benyair et al., 2015a)

5. Une alternative à la voie ERAD-protéasome, l'autophagie

Si les protéines aberrantes du RE sont principalement dégradées dans le cytosol par la voie ubiquitine-protéasome, d'autres voies de dégradation ont été également impliquées pour ces substrats, notamment l'autophagie.

A. Généralités sur l'autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation de protéines, de macromolécules et/ou d'organelles destiné à recycler des constituants cellulaires. Ce phénomène est très conservé chez les eucaryotes et impliqué dans la survie cellulaire, ainsi que dans différentes situations pathologiques. Chez les mammifères, on distingue 3 types d'autophagie : l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA pour Chaperon Mediated Autophagy), la micro-autophagie et la macro-autophagie. Le point commun de ces différents modes de dégradation est l'acteur final : les substrats capturés sont tous acheminés vers le lysosome où les différentes enzymes vont dégrader les macromolécules afin d'en recycler les constituants. (Parzych and Klionsky, 2014; Yorimitsu and Klionsky, 2005)

Au cours de la micro-autophagie, le contenu cytoplasmique est directement capturé par une déformation/invagination de la membrane lysosomale. Les mécanismes en restent cependant assez mal connus. (Mijaljica et al., 2011)

L'autophagie médiée par les chaperonnes est le type d'autophagie le plus ciblé. Décrit uniquement chez les mammifères, elle nécessite la reconnaissance des motifs pentapeptidiques KFERQ par la chaperonne HSPA8 (motif présent sur 30% des protéines cytosoliques environ). (Dice, 1990) Les protéines cibles sont ensuite dépliées et transférées à un récepteur membranaire lysosomal, la protéine LAMP2A (lysosomal associated membran protein 2A). Cette liaison permet de mettre en place le complexe de translocation qui permettra à la protéine cible d'être transférée dans le lysosome pour y être dégradée (Orenstein and Cuervo, 2010)

La macro-autophagie diffère des deux autres sur deux points. Elle se réalise par la capture de ses cibles à l'intérieur d'une vésicule appelée autophagosome constituée de novo et non à partir d'une membrane préexistante. Par ailleurs, cette capture se réalise à distance du lysosome. La première étape (la nucléation) consiste à générer un système membranaire

d'abord dénommé phagophore. (Parzych and Klionsky, 2014; Yorimitsu and Klionsky, 2005) Celui-ci doit ensuite être amplifié afin de cerner complètement la cible de l'autophagie : on parle d'élongation. L'acteur le plus étudié dans cette étape est le LC3, qui subit lors de l'autophagie une conversion de la forme LC3-I (non conjuguée) en LC3-II, forme conjuguée avec la phosphatidylethanolamine. L'étude par western-blot des différentes formes de LC3 constitue un marqueur d'activation de l'autophagie. Une fois l'élongation terminée, le phagophore aura suffisamment grandi pour englober complètement sa cible, devenant un authentique autophagosome. Celui-ci pourra alors fusionner avec les lysosomes pour devenir un autolysosome à l'intérieur duquel les macromolécules seront dégradées, et leurs constituants recyclés pour de nouvelles synthèses ou pour fournir de l'énergie. (Parzych and Klionsky, 2014; Wang and Klionsky, 2003; Yorimitsu and Klionsky, 2005)

B. Rôle de l'autophagie dans le contrôle qualité des protéines sécrétées

Une première preuve de l'implication de l'autophagie dans le contrôle qualité de la voie de sécrétion vient de l'étude de souris déficientes en facteurs de l'autophagie qui présentaient des pathologies neurologiques et hépatiques liées à l'accumulation de protéines ubiquitinées. (Komatsu et al., 2006) L'implication de l'autophagie a ensuite été clairement démontrée pour un modèle de protéine soluble aberrante : le mutant Z de l' α 1-anti-trypsine. (Kamimoto et al., 2006; Kruse et al., 2006) Ce rôle de l'autophagie a par la suite été confirmé pour d'autres modèles de protéines comme le procollagène, la dysferline ou le GnRHR, entre autres. (Fujita et al., 2007; Houck et al., 2014; Ishida et al., 2009)

L'implication de l'autophagie dans le contrôle qualité des glycoprotéines de la voie de sécrétion semble ainsi constituer une voie de secours, lorsque le système ERAD-protéasome est dépassé. Un premier point allant dans ce sens est que certains des substrats étudiés sont généralement dégradés à la fois par le protéasome et par l'autophagie. (Kamimoto et al., 2006; Kruse et al., 2006) Par ailleurs, il s'agit d'une voie de dégradation préférentiellement mise en place lorsque les protéines anormales ont tendance à s'agréger ou présenteraient des difficultés pour être disloquées. En effet, les protéines suffisamment mal conformées sont également suffisamment peu repliées pour pouvoir être disloquées facilement et dégradées par le protéasome. Par contre, des protéines anormales ayant déjà acquis une certaine structure peuvent constituer de mauvais substrats de l'ERAD, plus difficiles à rétro-transloquer. Dans ces conditions, les protéines aberrantes ne peuvent être éliminées par les voies classiques de

l'ERAD. Du fait de leur caractère potentiellement toxique, la cellule met en jeu un système de protection afin d'éliminer ces anomalies en digérant de façon relativement ciblée les régions du RE contenant ces protéines anormales. (Fujita et al., 2007; Houck et al., 2014; Kruse et al., 2006)

6. Le stress du réticulum endoplasmique

A. Stress du RE et Unfolded Protein Response

L'homéostasie du réticulum est perturbée lorsque l'influx de polypeptides naissants non repliés excède les capacités de repliement de ce compartiment cellulaire. Ceci conduit à l'accumulation de protéines mal conformées, situation appelée stress du RE. Cette situation peut être observée lors de la sur-expression de protéines normales, ou en cas d'expression de protéines mutantes à la maturation déficiente. Dans ce dernier cas, on parle de maladie conformationnelle. (Schröder and Kaufman, 2005) Des situations physiologiques telles que la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes s'accompagnent d'une intense augmentation de l'activité de sécrétion de telle sorte que l'influx de protéines dans le RE crée un stress du RE. (Calfon et al., 2002)

Dans ces conditions, une réponse adaptative dénommée Unfolded Protein Response ou UPR est mise en place afin de rétablir l'homéostasie du réticulum. Le flux entrant est limité en diminuant globalement la traduction des ARNm codant des protéines sécrétées. L'élimination des protéines mal conformées est également stimulée en augmentant l'expression des acteurs de l'ERAD. Par ailleurs, la capacité de maturation de la voie de sécrétion est augmentée via une expansion du volume du RE (permettant de diluer les protéines aberrantes) associée à une augmentation d'expression des chaperonnes et foldases. (Ron and Walter, 2007; Schröder and Kaufman, 2005)

a. Les voies de signalisation de l'UPR

Chez les mammifères, l'UPR se subdivise en 3 voies en fonction du senseur initiant la signalisation : inositol requiring kinase 1 (IRE1), double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) et activating transcription factor 6 (ATF6). (Schröder and Kaufman, 2005)

- *Inositol Requiring kinase 1 (IRE1)*

IRE1 est une protéine transmembranaire de type 1 portant un domaine de dimérisation du côté luminal. (Liu et al., 2002) Sa partie cytosolique porte par ailleurs des domaines à activité kinase et endoribonucléase. (Figure 11)

En conditions basales IRE1 est trouvée sous forme monomérique. Lors d'un stress du RE, elle se dimérise, permettant ainsi par le rapprochement des domaines kinases une trans-autophosphorylation. (Bertolotti et al., 2000; Liu et al., 2002) Ceci induit un changement de conformation conduisant à l'activation de sa fonction endoribonucléase dédiée à l'épissage de XBP1. (Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2001) Cet épissage est dit non-conventionnel car il n'utilise ni la machinerie classique d'épissage, ni les séquences habituelles de reconnaissance des jonctions introns-exons. (Schröder and Kaufman, 2005) L'étude de l'épissage de XBP1 constitue un marqueur de stress du RE communément utilisé. L'excision des 26 nucléotides aboutit à un décalage du cadre de lecture responsable de la génération d'une « nouvelle » protéine portant une activité de facteur de transcription. (Figure 12, Calfon et al., 2002; Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2001)

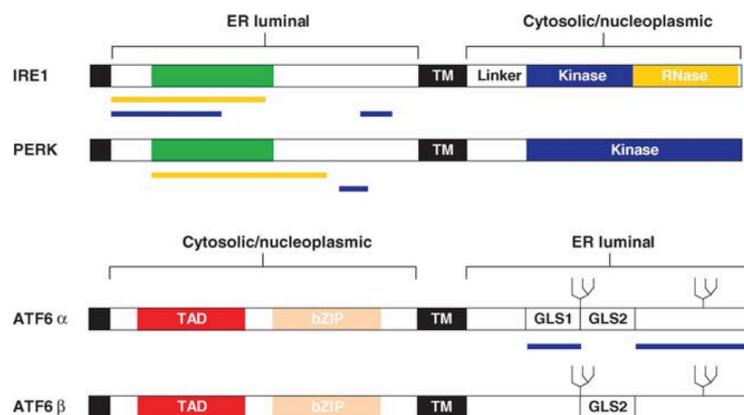


Figure 11 : Représentation schématique de la structure linéaire des trois senseurs de l'UPR : IRE1, PERK et ATF6.

Les barres jaunes indiquent les domaines suffisants pour assurer la transduction du signal ou l'oligomérisation. Les barres bleues représentent les régions impliquées dans l'interaction avec BiP. Les régions en noir correspondent aux peptides signaux et celles en vert aux régions d'homologie entre IRE1 et PERK. bZIP : *basic leucin zipper*; GLS1 et GLS2 : *Golgi localization sequences 1 et 2*; TAD : *Transcriptional Activation Domain*; TM : domaine transmembranaire (Schröder and Kaufman, 2005)

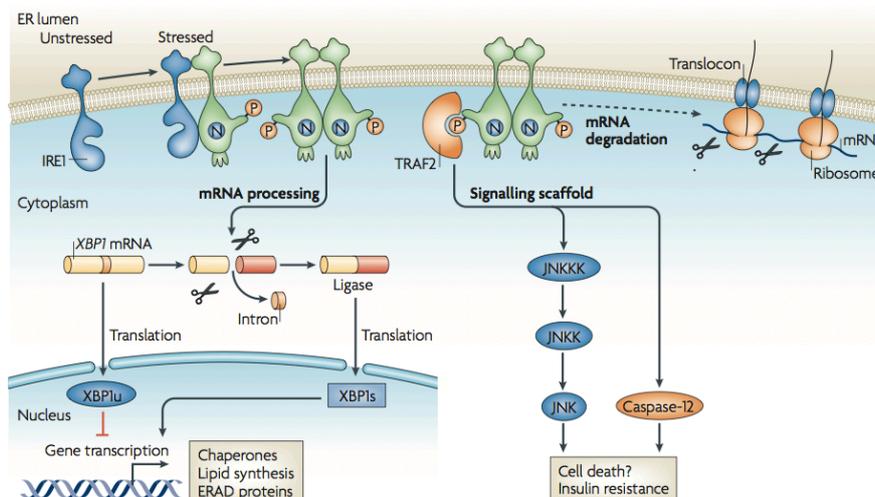


Figure 12 : Signalisation initiée par IRE1.

En cas de stress du RE, IRE1 s'oligomérisse, permettant ainsi une trans-autophosphorylation de sa partie cytosolique et activant par là même sa fonction endoribonucléase. Cette activité s'exprime envers XBP1 (chez les mammifères) dont l'épissage non conventionnel conduit à la génération d'un facteur de transcription régulant l'expression de différents gènes impliqués dans l'ERAD ou la biogénèse du RE. IRE1 est également impliquée dans la génération d'un signal pro-apoptotique *via* son association avec TRAF2. Enfin, IRE1 est impliquée dans la dégradation d'ARNm afin de reprogrammer la synthèse protéique en cas de stress du RE. (Ron and Walter, 2007)

- *Double-stranded RNA-activated Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK)*

Comme IRE1, PERK est une protéine transmembranaire de type 1 présentant un domaine d'oligomérisation au niveau luminal. (Figure 11) A l'état physiologique, PERK est également maintenue dans un état monomérique inactif. En cas de stress du RE, sa dimérisation permet une trans-autophosphorylation. L'activité kinase de PERK s'exerce ensuite sur différents substrats. (Figure 13, Cullinan et al., 2003; Harding et al., 1999; Pytel et al., 2016) La phosphorylation d'eIF2 α permet de diminuer globalement la traduction dans les cellules (Harding et al., 1999), mais également d'activer la traduction des ARNm codant pour le facteur de transcription ATF4 et le transporteur Lysine/Arginine Cat-1. (Harding et al., 2000; Scheuner et al., 2001; Yaman et al., 2003) La phosphorylation de Nrf2 conduit à son activation et à l'expression de ses gènes cibles participant à la régulation de la balance redox. (Cullinan et al., 2003) D'autres substrats de PERK ont récemment été mis en évidence, comme les facteurs de transcription de la famille FOXO ou le diacylglycérol. (Pytel et al.,

2016)

Si la diminution de traduction globale est nécessaire lors d'un stress du RE, il est également capital qu'elle ne dure pas trop longtemps. Différentes phosphatases veillent ainsi à ce qu'eIF2 α soit déphosphorylée lorsque l'accumulation de protéines mal conformées perdure trop longtemps. Notamment, l'activité de la Protein Phosphatase 1 (PP1) est régulée par GADD34 dont l'expression est induite tardivement par ATF4. Il existe donc une boucle de rétro-contrôle négatif qui permet d'éviter la persistance d'une extinction de traduction potentiellement délétère. (Brush et al., 2003; Ma and Hendershot, 2004a)

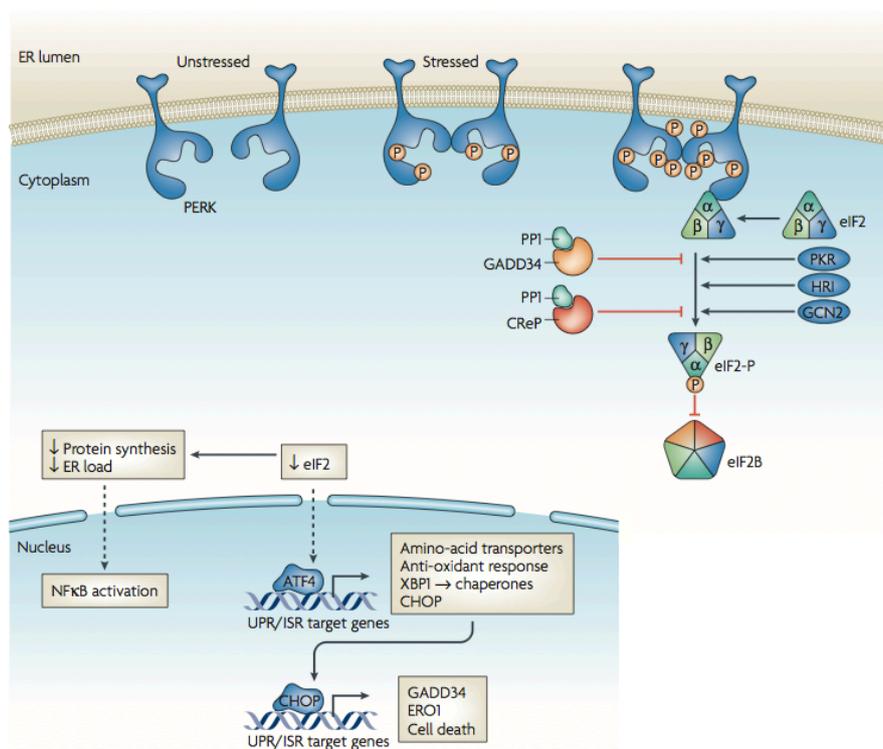


Figure 13 : Voie de signalisation activée par PERK.

Lors d'un stress du RE, PERK s'oligomérisse avant de se trans-autophosphoryler. Son activité kinase s'exerce ensuite sur deux substrats : eIF2 α et Nrf2. La phosphorylation du premier est associée à une diminution de la traduction globale, avec cependant une activation de la traduction d'ATF4, facteur de transcription activant l'expression de différents gènes cibles dont certains sont indiqués sur le schéma. (Ron and Walter, 2007)

- *ATF6*

ATF6 est une protéine transmembranaire de type 2 résidente du RE. (Figure 11, Chen et al., 2002; Shen et al., 2002) Lors d'un stress du réticulum, elle est exportée en direction du Golgi où une sérine protéase (Site 1 Protease ou S1P) clive son domaine luminal, tandis que la métalloprotéase S2P (Site 2 Protease) en coupe la partie N-terminale directement à l'intérieur de la bicouche lipidique. (Chen et al., 2002; Haze et al., 1999; Ye et al., 2000) Ceci permet la libération du domaine cytosolique appelé ATF6f (f pour fragment) qui est un facteur de transcription de type « basic leucin zipper ». (Figure 14) Après translocation dans le noyau, l'activation de différents gènes cibles peut être ainsi stimulée.

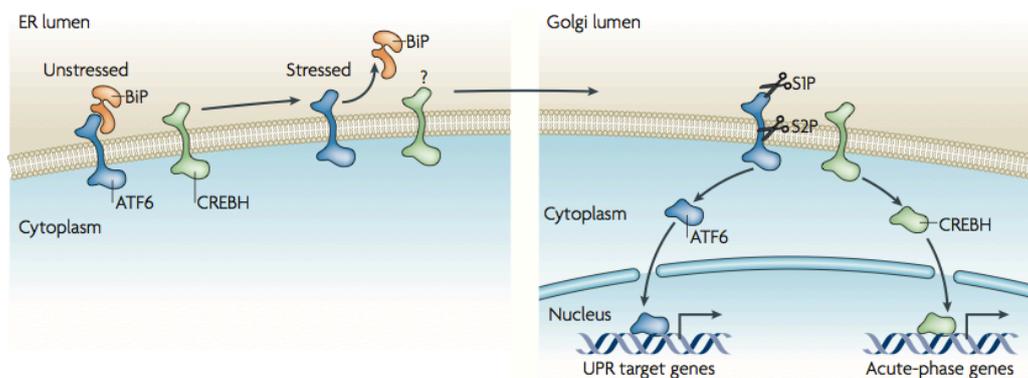


Figure 14 : Signalisation associée à ATF6.

En cas de stress du RE, ATF6 est exportée du RE vers le Golgi où des protéases libèrent le fragment cytoplasmique portant une activité facteur de transcription responsable de l'activation de l'expression des gènes cibles de cette voie. (Ron and Walter, 2007)

L'activation des trois voies de l'UPR est en partie dépendante de BiP. Dans des conditions basales, ce facteur se lie au domaine luminal des trois protéines senseurs pour les maintenir dans un état inactif. Lors d'un stress du RE, BiP se liant aux régions hydrophobes des protéines aberrantes, les domaines de dimérisation de IRE1 et PERK sont démasqués. Ces facteurs vont alors pouvoir se dimériser et s'auto-transphosphoryler. La titration de BiP d'ATF6 démasque un site permettant son export en direction de l'appareil de Golgi où le facteur sera activé. (Bertolotti et al., 2000; Shen et al., 2002) La détection de protéines mal conformées par ces senseurs du RE pourrait également se faire via une liaison directe avec les substrats aberrants, au niveau du sillon constitué au sein des dimères d'IRE1 et de PERK. (Ron and Walter, 2007)

Bien que l'activation des trois branches de l'UPR soit observée au cours d'un stress du RE, leur cinétique de signalisation est variable, permettant d'adapter la réponse de la cellule à une situation de stress prolongée. (Lin et al., 2007) Par ailleurs, afin de coordonner les signaux générés, une régulation fine est médiée par des interactions protéine-protéine (au moins pour IRE1) conduisant à la formation de complexes dénommés UPRosomes qui contrôlent l'amplitude et la temporalité de la signalisation. (Woehlbier and Hetz, 2011)

b. Conséquences de l'activation de l'UPR

L'UPR étant une réponse adaptative à une situation d'accumulation de protéines mal conformées dans le RE, la signalisation déclenchée par les trois senseurs a pour but la mise en place de différents mécanismes afin de rétablir l'homéostasie de ce compartiment cellulaire.

- *Réduction du flux entrant de protéines dans le RE*

L'une des réponses précoces a pour finalité de réduire le flux de protéines entrant dans le RE afin de limiter la charge de protéines à maturer. Pour ce faire, le premier mécanisme identifié est la phosphorylation d'eIF2 α qui permet de diminuer globalement la traduction dans les cellules. (Harding et al., 1999) Plus récemment, un système de contrôle qualité préemptif des protéines a été découvert. Celui-ci consiste en une sélection des protéines transloquées dans le RE en fonction de la séquence de leur peptide signal. Dans des conditions de stress du RE, ce système permet de bloquer l'entrée de protéines dans la voie de sécrétion, et de les rediriger dans le cytosol, les condamnant ainsi à une dégradation. Au contraire, la traduction de protéines importantes pour l'UPR comme BiP est favorisée. (Kang et al., 2006) La charge protéique du RE peut par ailleurs être allégée par un système de dégradation co-traductionnel dépendant d'ERdj6. Ce processus permet d'intercepter les protéines au cours de leur synthèse pour les diriger vers le protéasome. (Oyadomari et al., 2006) Au cours d'un stress du RE, un détachement massif des ribosomes de la membrane du RE peut également être observé, bloquant la synthèse de nouvelles protéines. (Reid et al., 2014) Enfin, IRE1 est également capable de dégrader les ARNm codant pour des ARNr (Iwawaki et al., 2001) ou des protéines entrant dans le RE (Hollien, 2006) limitant ainsi l'afflux de protéines à ce niveau. On parle d'activité RIDD pour *Regulated IRE-1-Dependant Decay of mRNA*.

- *Augmentation des capacités chaperonnes et dégradation des protéines anormales*

Dans un 2ème temps, l'activation des trois voies de l'UPR conduit les cellules à stimuler l'expression de gènes codant des protéines chaperonnes, des foldases ou des protéines impliquées dans la voie de sécrétion. (Lee et al., 2002; Okada et al., 2002; Ron and Walter, 2007; Schröder and Kaufman, 2005) Ceci a pour but, d'optimiser la maturation des protéines mal conformées et de réduire ainsi la charge de protéines à replier dans le RE.

Parallèlement, la dégradation des protéines mal conformées va être favorisée par une induction de gènes codant des facteurs de l'ERAD. (Yoshida et al., 2003) Comme déjà évoqué précédemment, l'expression de protéines telles qu'EDEM1/2/3, UGT1, Herp, HRD1 est induite par un stress du RE. (Hirao et al., 2006; Hosokawa et al., 2001; Ma and Hendershot, 2004b; Olivari et al., 2005) Parallèlement, l'expression de beaucoup des facteurs de l'autophagie est également stimulée par l'UPR. Ces facteurs importants pour la survie cellulaire au cours d'un stress du RE permettent en effet de participer à l'élimination des agrégats protéiques constituant de mauvais substrats pour l'ERAD. (Bernales et al., 2006; Yorimitsu et al., 2006)

Les gènes codant des facteurs participant à d'autres voies métaboliques importantes pour l'homéostasie du RE (métabolisme des acides aminés, état d'oxydoréduction de la cellule) sont également la cible de l'UPR. (Cullinan and Diehl, 2004; Cullinan et al., 2003; Harding et al., 2003; Ye and Koumenis, 2009)

Un autre aspect de la réduction de la charge en protéine mal conformée est l'expansion du réticulum observée en réponse à un stress du RE. L'expression forcée de XBP1s induit la synthèse de phosphatidylcholine (le phospholipide majoritaire des membranes cellulaires) et une expansion du RE, permettant ainsi de diluer les protéines mal conformées. (Shaffer et al., 2004; Sriburi et al., 2004)

Notons, qu'afin de permettre l'expression de ces gènes cibles de l'UPR, il est nécessaire pour la cellule de déphosphoryler eIF2 α via l'activité de GADD34 afin de ré-initier la synthèse protéique. Il existe ainsi une reprogrammation du RE avec synthèse de facteurs augmentant les capacités sécrétrices de la cellule. (Novoa et al., 2001; Ron and Walter, 2007)

- *En cas d'échec, une seule issue possible : la mort par apoptose*

Malgré les mécanismes mis en place, les cellules peuvent échouer à rétablir l'homéostasie au niveau du RE. Il est alors nécessaire d'éliminer ces cellules afin de limiter l'impact négatif qu'elles pourraient avoir. Cette « UPR terminale » passe par l'induction d'une apoptose.

Le facteur de l'UPR dont l'activité pro-apoptotique est la plus étudiée est CHOP (C/EBP-Homologous Protein). Ce facteur induit principalement par la voie PERK peut réprimer l'expression du facteur anti-apoptotique BCL-2 (McCullough et al., 2001), mais aussi stimuler celles de divers facteurs pro-apoptotiques : facteurs de la famille BH3-only ou Death Receptor 5 (DR5) par exemple. (Fu et al., 2010; Lu et al., 2014; Puthalakath et al., 2007; Tabas and Ron, 2011; Yamaguchi and Wang, 2004) D'autres mécanismes ont également été évoqués, notamment la libération de calcium du RE ou la stimulation d'un stress oxydatif. (Tabas and Ron, 2011)

CHOP n'est cependant pas le seul facteur impliqué dans la mort induite par un stress du RE. Ainsi, la déphosphorylation de eIF2 α en ré-induisant la synthèse protéique peut être à l'origine d'un stress protéotoxique et oxydant pouvant mener à la mort cellulaire. (Han et al., 2013; Marciniak et al., 2004) L'activité RIDD d'IRE1 peut également participer à l'induction de l'apoptose en dégradant les ARNm de certaines cibles de l'UPR comme BiP ou des microARN impliqués dans la régulation de l'expression de gènes pro-inflammatoires ou pro-apoptotiques. (Han et al., 2009; Upton et al., 2012) Par ailleurs, IRE1 par son interaction avec TRAF2 peut favoriser l'activation de JNK, un facteur associé à la mort cellulaire. (Urano et al., 2000) Au final, la plupart des signaux pro-apoptotiques émis lors de l'UPR conduisent à l'activation de la voie canonique mitochondriale de l'apoptose, avec notamment la libération de cytochrome c permettant l'activation de caspases effectrices comme la caspase 3. (Figure 15)

Les mécanismes d'aiguillage entre tentative d'augmentation des capacités chaperonnes du RE et mort cellulaire restent encore incomplètement compris. Cependant, la durée variable d'activation des différentes voies de l'UPR pourrait jouer un rôle dans le déclenchement de l'apoptose. La persistance de l'activation de PERK associée à une extinction de la voie IRE1-XBP1 conduit à l'expression des facteurs pro-apoptotiques et une atténuation de l'effet pro-survie exercé par XBP1s (forme épissée de XBP1). (Lin et al., 2007) Lorsque les facteurs pro-

apoptotiques sont exprimés au-dessus d'un certain seuil, la mort cellulaire peut-être initiée. Ces facteurs joueraient ainsi un rôle de minuteur, déclenchant l'apoptose uniquement lorsque le stress du RE est suffisamment prolongé, et donc considéré comme irrémédiable (Hetz et al., 2015; Rutkowski et al., 2006; Tabas and Ron, 2011)

Cette mort induite par un stress du RE constitue une cible thérapeutique de choix. En effet, c'est cette propriété qui est mise à profit par les traitements utilisant les inhibiteurs du protéasome tels que le Bortezomib utilisé dans le traitement des myélomes. L'inhibition de l'appareil de dégradation des protéines entraîne une accumulation irrémédiable de protéines anormales à l'origine de l'apoptose des cellules, préférentiellement celles présentant une sécrétion très active comme c'est le cas des plasmocytes. (Obeng et al., 2006)

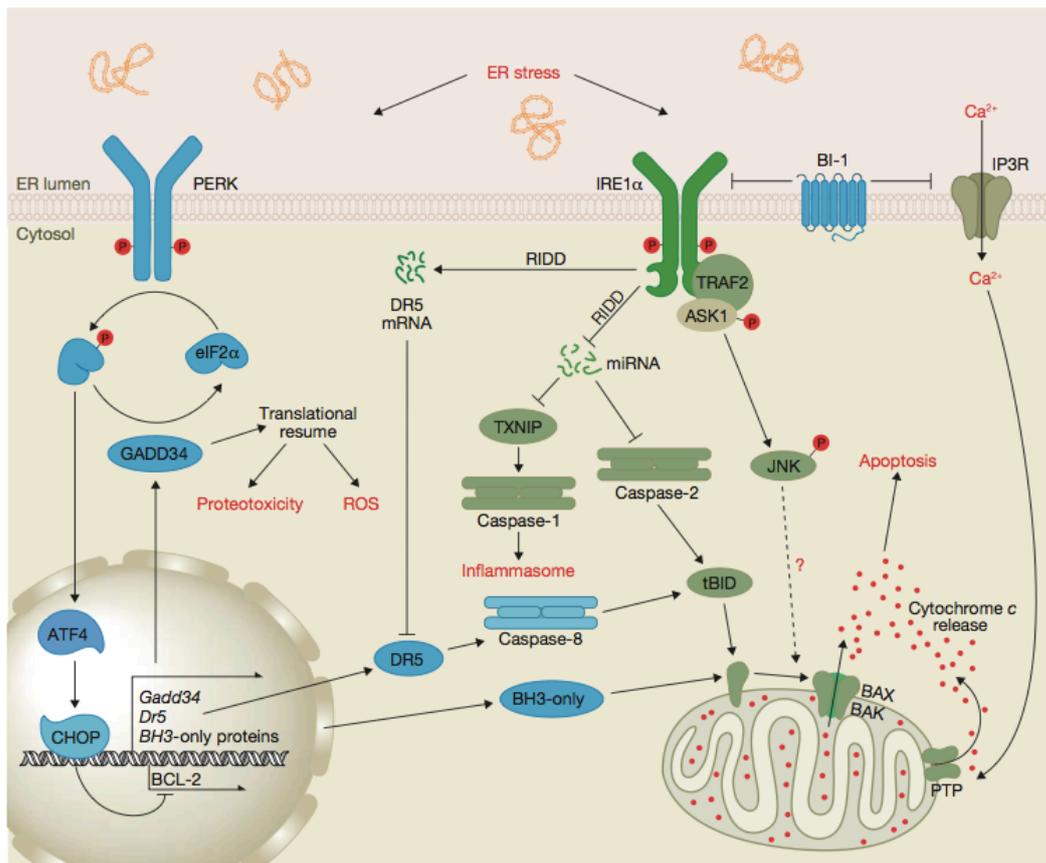


Figure 15 : Mécanismes déclenchant la mort cellulaire au cours d'un stress du RE.

La signalisation associée à PERK et IRE1 peut conduire à l'activation de l'apoptose par différentes voies. ATF4, activée en aval de PERK, présente comme cible CHOP elle même activant l'expression de différents gènes pro-apoptotiques et inhibant l'expression de gènes anti-apoptotiques. IRE1 est capable d'interagir avec TRAF2 pour conduire à l'activation de JNK. L'activité RIDD d'IRE1 peut également participer au déclenchement de la mort cellulaire. (Hetz et al., 2015)

B. Stress du RE, cancers et hémopathies

L'UPR est impliquée dans diverses pathologies telles que les maladies neurodégénératives, le diabète, l'athérosclérose, les maladies métaboliques et inflammatoires ou les infections virales ou bactériennes. (Wang and Kaufman, 2012)

Le rôle de l'UPR dans les tumeurs est également bien établi. Différentes causes peuvent expliquer l'activation de cette réponse au cours des cancers :

- l'expression d'oncogènes est associée à une augmentation de la synthèse protéique dépassant les capacités chaperonnes du RE et conduisant à l'accumulation de protéines mal conformées.
- des mutations peuvent être associées à un défaut de maturation de la protéine oncogénique elle-même qui est donc alors directement responsable du stress du RE.
- certaines tumeurs sont associées à une forte sécrétion protéique (comme les myélomes par exemple)
- les cellules cancéreuses, du fait d'un défaut de vascularisation, peuvent se retrouver dans un environnement hypoxique et pauvre en nutriments, conditions favorables au développement d'un stress du RE.

L'activation de l'UPR ou une sur-expression de ses cibles (et notamment les protéines chaperonnes) est ainsi identifiée dans la plupart des tumeurs solides, corrélant parfois avec leur agressivité. Les voies de signalisation ainsi activées peuvent participer aux différentes étapes du développement d'une tumeur, de la transformation jusqu'à la formation de métastases. Pour ce faire, l'UPR est associée à une reprogrammation transcriptionnelle favorisant la transformation, l'angiogenèse ou la formation de métastases. Le moyen le plus évident est une augmentation des capacités de synthèse et de repliement protéique permettant d'éviter aux cellules cancéreuses d'entrer en apoptose suite à un stress du RE trop intense. Mais des effets moins évidents sont également impliqués. Par exemple, il a été mis en évidence une reprogrammation métabolique destinée à optimiser les apports en glucose (notamment en augmentant l'expression du transporteur Glut1). (Manié et al., 2014) L'induction de l'autophagie par l'UPR peut également favoriser la survie des cellules

tumorales. La promotion d'une néo-angiogenèse, d'une dormance tumorale ou l'induction d'un état inflammatoire est également impliquée dans l'association de l'UPR avec le cancer. Enfin, l'UPR a été associée à une instabilité génétique et une chimiorésistance des cellules malignes. (Chevet et al., 2015; Wang and Kaufman, 2014) Cependant, les conséquences de l'activation des différentes voies peuvent dépendre du type de cancer, du statut prolifératif et du microenvironnement. (Luo and Lee, 2012)

L'implication de l'UPR dans les hémopathies malignes, bien que moins documentée que dans les tumeurs solides, est maintenant reconnue.

L'importance de XBP1 dans la différenciation plasmocytaire est connue depuis longtemps. (Calton et al., 2002) Son implication dans le développement des myélomes a également été largement démontrée, notamment dans un modèle murin de sur-expression de XBP1s. (Carrasco et al., 2007) Une activation de l'UPR dans les autres hémopathies lymphoïdes est également démontrée, que ce soit dans les lymphomes ou la Leucémie Lymphoïde Chronique, avec dans ce dernier cas une association avec l'agressivité de la maladie. (Krysov et al., 2014; Maestre et al., 2009; Tang et al., 2014a)

Au cours de leucémies aiguës myéloïdes (LAM), une activation de l'UPR peut être observée chez 16-17% des patients. Une participation à la physiopathologie de ces maladies a été suggérée via l'inhibition de la traduction de C/EBP α . (Haefliger et al., 2011; Schardt et al., 2010) Mimant en quelque sorte une mutation bi-allélique de ce facteur de transcription cette inhibition de C/EBP α pourrait expliquer le bon pronostic associé à l'activation de l'UPR dans les LAM. (Schardt et al., 2009) Dans les leucémies aiguës promyélocyaires, la protéine de fusion PML-RAR α interagit avec N-CoR. Cette interaction conduit à la rétention de N-CoR dans le RE du fait de son agrégation ainsi qu'à une activation d'ATF6. Une dégradation de N-CoR est ainsi déclenchée, s'opposant à la répression transcriptionnelle assurée par ce facteur important pour la différenciation myéloïde. Forcer la différenciation myéloïde en traitant les cellules par de l'acide tout-trans rétinolique (ATRA) permet de réduire la formation d'agrégats par N-CoR et de lever le stress du RE observé dans ce modèle. Au contraire l'induction d'un stress du RE par la tunicamycine réduit la différenciation cellulaire induite par l'ATRA. (Khan et al., 2004)

Le rôle de XBP1 et de BiP dans les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL) semble également important, leur inhibition étant associée à une augmentation de la mort

cellulaire. Par ailleurs, un haut niveau d'expression de XBP1 est associé à un pronostic défavorable dans les LAL-B. (Kharabi Masouleh et al., 2014)

Les données associant l'UPR aux Syndromes Myéloprolifératifs (SMP) sont plus limitées. BCR-ABL1, la protéine de fusion responsable de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), est capable d'induire un stress du RE. (Tanimura et al., 2009) Cette étude a par ailleurs mis en évidence que l'inhibition d'ATF6 ou de IRE1 favorise la mort cellulaire induite par l'étoposide et l'imatinib. L'implication d'ATF6 dans la protection des cellules contre l'apoptose induite par l'imatinib a récemment été confirmée. (Higa et al., 2014) Il semblerait qu'une activation de la voie PERK soit également impliquée dans cette maladie, particulièrement dans les phases d'accélération ou blastique. (Kusio-Kobialka et al., 2012) Par contre, aucune donnée n'est disponible à ce jour sur le rôle de l'UPR dans les SMP non-LMC.

Quelle que soit l'hémopathie considérée, l'UPR semble constituer une cible thérapeutique intéressante, l'inhibition de ses acteurs pouvant déclencher une apoptose à elle seule ou en association avec des drogues déjà utilisées en pratique clinique. (Higa et al., 2014; Kharabi Masouleh et al., 2014; Kusio-Kobialka et al., 2012; Mimura et al., 2012; Papandreou et al., 2011; Rosati et al., 2010; Sun et al., 2016; Tang et al., 2014a; Tanimura et al., 2009; Uckun et al., 2011)

II. Les syndromes myéloprolifératifs

1. Hématopoïèse, mégacaryopoïèse

A. Généralités sur l'hématopoïèse

La production des cellules sanguines, ou hématopoïèse, est un processus finement régulé permettant d'assurer la génération des différentes lignées en continu et de façon adaptée aux besoins de l'organisme. Chaque jour plus de 100 milliards de cellules sanguines sont ainsi produites. Chez l'adulte, ce processus prend place au niveau de la moelle osseuse où sont retrouvées les cellules souches hématopoïétiques. Principalement quiescentes, ces cellules sont par ailleurs capables d'auto-renouvellement afin de conserver un stock suffisant tout au long de la vie et éviter leur épuisement. Sous l'influence de différents stimuli, ces cellules pourront se différencier vers l'ensemble des lignées hématopoïétiques (elles sont multipotentes) en passant par des stades de progéniteurs puis de précurseurs avant de générer des cellules matures qui rejoindront la circulation sanguine.

Différentes lignées sanguines sont distinguées. Une première dichotomie consiste à séparer les cellules lymphoïdes (donnant les lymphocytes) des cellules myéloïdes. Ces dernières se subdivisent ultérieurement en polynucléaires (ou granulocytes), monocytes, hématies (ou globules rouges) et plaquettes. Chacune de ces populations assure des fonctions différentes. Schématiquement, les lymphocytes participent à l'immunité (innée et adaptative), les polynucléaires et monocytes à l'immunité innée, tandis que les hématies transportent l'oxygène aux tissus et les plaquettes assurent un rôle dans l'hémostase.

Les besoins de l'organisme étant variables dans le temps, une adaptation de la production des cellules sanguines « en temps réel » est nécessaire et fait intervenir de multiples acteurs. Un premier type de régulateur peut être identifié comme le microenvironnement médullaire. La « niche hématopoïétique » constitue un milieu pourvoyeur de signaux favorisant la quiescence et l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques. (Boulais and Frenette, 2015) Différents types cellulaires participent à cette niche : ostéoblastes, ostéoclastes, cellules périvasculaires (cellules CAR, CXCL12-abundant reticular), cellules endothéliales, cellules nerveuses du système sympathique, cellules de

Schwann. Elles apportent aux cellules hématopoïétiques des facteurs régulant le maintien des cellules souches dans la moelle, ainsi que leur différenciation tels que CXCL12, TGF- β , angiopoïétine, noradrénaline, ... D'autres paramètres se surajoutent, notamment les protéines de la matrice extracellulaire ou la faible concentration en oxygène qui est associée à une quiescence des cellules souches. (Boulais and Frenette, 2015) Le rôle des cytokines dans le contrôle de l'hématopoïèse est également capital et connu depuis très longtemps. Ces glycoprotéines (sécrétées par le microenvironnement, les cellules hématopoïétiques ou par des organes à distance tels que les reins ou le foie) agissent au niveau de récepteurs membranaires et régulent le devenir des cellules hématopoïétiques afin de maintenir leur quiescence, favoriser leur auto-renouvellement, leur différenciation, leur prolifération ou empêcher la mort cellulaire. Leur action peut être dirigée sur plusieurs lignées ou restreinte à une voie de différenciation ou à une population plus ou moins mature. (Robb, 2007)

B. Mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse correspond aux phénomènes permettant la production des plaquettes. Ces cellules anucléées de 1-3 μm de diamètre sont impliquées dans l'hémostase, mais aussi la régénération des tissus, l'angiogenèse, l'inflammation, l'immunité innée. Les mégacaryocytes, les cellules médullaires qui leur donnent naissance, sont les cellules les plus grosses et les plus rares de la moelle osseuse. Deux phénomènes uniques sont mis en jeu dans la mégacaryopoïèse. Au cours d'un processus d'endomitose, les cellules deviennent polyploïdes. Ce phénomène unique résulte d'une réplication d'ADN sans division cellulaire aboutissant à la formation de cellules pouvant présenter jusqu'à 128n chromosomes. Après une phase de maturation durant laquelle des membranes de démarcation et différents types de granulations sont mises en place, les mégacaryocytes émettent des expansions cytoplasmiques appelées pro-plaquettes. Ces structures projetées à travers la paroi des sinusoides médullaires sont alors fragmentées dans le flux sanguin libérant des « portions » cytoplasmiques contenant les organelles et granules correspondant aux plaquettes. (Machlus and Italiano, 2013)

La thrombopoïétine (TPO) est le principal facteur de croissance régulant la mégacaryopoïèse. (Kaushansky, 1998) Elle est sécrétée principalement par le foie, et dans une moindre mesure par les reins et dans la moelle osseuse. Son taux circulant est régulé par la masse de plaquettes et de mégacaryocytes qui la captent et assurent sa destruction, créant ainsi une boucle de régulation. (Kaushansky, 2005) Sa sécrétion hépatique est également régulée

par un récepteur stimulé par les plaquettes âgées désialylées. (Grozovsky et al., 2015) La thrombopoïétine affecte tous les aspects de la mégacaryopoïèse, depuis l'expansion et l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques jusqu'à la formation des proplaquettes. (Kaushansky, 2005)

Le récepteur de la TPO, c-MPL, a été identifié dans les années 90. (Vigon et al., 1992) Il appartient à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance hématopoïétiques de type I. Exprimé principalement au niveau des cellules souches, des mégacaryocytes (ainsi que leurs progéniteurs) et des plaquettes, il est dépourvu d'activité enzymatique propre. A la suite de la liaison de son ligand, il déclenche toutefois une cascade de signalisation impliquant les tyrosine kinases qui lui sont associées, principalement JAK2. A l'état basal, le récepteur est sous forme homodimérique avec une conformation maintenant les domaines cytosoliques éloignés. La liaison de la TPO à son récepteur entraîne un changement de conformation rapprochant ces domaines l'un de l'autre, et par là-même les tyrosine kinases JAK2. Ainsi rapprochées, celles-ci vont s'auto-transphosphoryler avant de phosphoryler MPL lui-même et les acteurs de la signalisation en aval : principalement STAT5, PI3K et MAPK. (Vainchenker et al., 2011) L'intensité de la signalisation semble mettre en jeu ces différentes voies de signalisation de manière distincte, et ainsi jouer sur les divers aspects de la différenciation mégacaryocytaire : alors qu'une signalisation faible favorise la prolifération cellulaire, une signalisation forte bloque la prolifération pour engager la différenciation cellulaire via la voie des MAPK. (Besancenot et al., 2014)

2. Les Syndromes Myéloprolifératifs

A. Présentation clinico-biologique :

Le terme « syndromes myéloprolifératifs » (SMP) introduit par William Dameshek (Dameshek, 1951) rassemble au sein d'un même groupe plusieurs hémopathies partageant certaines similarités cliniques et biologiques. Les principaux (et plus fréquents) SMP sont la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocythémie Essentielle (TE) et la Myélofibrose Primitive (MFP). La classification de l'OMS a ensuite rattaché à ce groupe d'hémopathies les Leucémies Chroniques à Neutrophiles (LCN), les Syndromes Hyperéosinophiliques (SHE) et les SMP inclassables. (Arber et al., 2016)

Schématiquement, les SMP sont divisés en 2 groupes. D'un côté la LMC caractérisée par la présence du chromosome Philadelphie (Nowell and Hungerford, 1960) résultant de la translocation t(9;22)(q34;q11). (Rowley, 1973) De l'autre côté, les SMP dit « Philadelphie-négatifs » (SMP-Ph négatifs) qui, par opposition à la LMC, ne présentent pas le transcrit de fusion BCR-ABL1 (équivalent moléculaire de la translocation t(9;22)) et dont les formes dites « typiques » rassemblent la PV, la TE et la MFP.

Les SMP sont la conséquence d'anomalies des cellules souches hématopoïétiques à l'origine d'une hypersensibilité ou d'une indépendance vis-à-vis de la régulation exercée par les cytokines. (Campbell and Green, 2006; Delhommeau et al., 2006) Ils sont caractérisés par une prolifération cellulaire excessive avec une maturation cellulaire conservée responsable d'une augmentation du taux de cellules matures. La MFP déroge quelque peu à cette règle puisqu'il existe dans cette maladie des anomalies de maturation des mégacaryocytes. Cette myéloprolifération implique les trois lignées myéloïdes mais prédomine sur l'une (ou deux) d'entre elles : la lignée granuleuse pour la LMC, la lignée érythroïde pour la PV, la lignée mégacaryocytaire pour la TE et les lignées mégacaryocytaire et granulocytaire pour la MFP. (Tefferi et al., 2009a) Il ne s'y associe pas de dysmyélopoïèse, ce qui distingue les SMP des Syndromes Myélodysplasiques (SMD) et des syndromes « frontières » SMP/SMD tels que les Leucémies Myélomonocytaires Chroniques (LMMC), les Leucémies Myélomonocytaires Juvéniles (LMMJ) ou les LMC atypiques. (Arber et al., 2016)

a. Leucémie Myéloïde Chronique

La LMC est caractérisée par une prolifération cellulaire intéressant majoritairement les lignées granuleuses. Classiquement les patients présentent une hyperleucocytose massive (médiane > 100 G/L) liée à une polynucléose neutrophile associée à une myélémie, une éosinophilie, une basophilie. (Savage et al., 1997; Swerdlow et al., 2008) Une thrombocytose modeste est généralement observée (médiane 430 G/L). Cependant 11% des patients présentent une thrombocytose > 1000 G/L. Une splénomégalie est détectée dans 75% des cas. Le plus souvent asymptomatique au diagnostic, des symptômes tels que des manifestations hémorragiques, des pertes de poids, sueurs ou symptômes liés à la splénomégalie peuvent parfois être observés. (Savage et al., 1997) En l'absence de traitement, l'évolution se fait vers une transformation en Leucémie Aiguë (LA) avec décès dans les 5 ans. (Swerdlow et al., 2008) L'histologie médullaire révèle classiquement la présence de mégacaryocytes de petite

taille et hypolobés (le terme de mégacaryocytes « nains » est souvent employé). (Swerdlow et al., 2008)

b. Polyglobulie de Vaquez

La PV est caractérisée par une prolifération cellulaire portant principalement sur la lignée érythroblastique, à l'origine d'une augmentation des taux d'hématies et d'hémoglobine et de l'hématocrite. Une polynucléose neutrophile ainsi qu'une thrombocytose peuvent s'y associer, pouvant mimer une TE lorsque la polyglobulie reste modérée. L'histologie médullaire montre classiquement une prolifération des trois lignées myéloïdes (panmyélose) portant préférentiellement sur les lignées érythroblastique et mégacaryocytaire. (Swerdlow et al., 2008; Thiele, 2009; Thiele and Kvasnicka, 2006) Le caractère primitif de la myéloprolifération peut être étayé par le dosage de l'érythropoïétine (dont le taux sera abaissé, Mossuz et al., 2004) la mise en évidence d'une prolifération spontanée des progéniteurs en absence de cytokine (même si ce paramètre ne fait plus partie des critères OMS de PV, Dobo et al., 2004a) ou surtout par la mise en évidence de mutations de JAK2 (voir plus bas).

Les manifestations cliniques sont essentiellement liées à l'hyperviscosité, aux anomalies vasculaires secondaires et à l'augmentation de la masse sanguine. Les thromboses artérielles ou veineuses peuvent parfois révéler la maladie (12-39% des cas). (Cervantes et al., 2008) Des céphalées, vertiges et troubles de la vision ainsi que des érythroméalgies et paresthésies peuvent également être présents. Toutefois le signe clinique le plus spécifique est le prurit à l'eau. Une splénomégalie (70% des cas) et une hépatomégalie (40%) sont fréquemment présentes. (Swerdlow et al., 2008; Thiele, 2009)

La PV est associée à une légère diminution de survie et surtout à une altération de la qualité de vie en lien avec les événements thrombo-emboliques. L'incidence des thromboses est estimée à 18 pour 1000 personnes-années, alors que celles des transformations en myélofibrose ou LA est évaluée à 5 pour 1000 patients-années (avec un délai de survenue médian de 13-14 ans). (Cervantes et al., 2008; Passamonti et al., 2004)

c. Thrombocytémie Essentielle

La TE est caractérisée par une prolifération cellulaire portant essentiellement sur la lignée mégacaryocytaire. La thrombocytose est donc l'anomalie principale orientant vers une TE avec souvent une anisocytose plaquettaire. La leucocytose est généralement normale ou très légèrement augmentée, sans basophilie associée. L'histologie médullaire montre une moelle normo-cellulaire ou de richesse légèrement augmentée avec principalement une hyperplasie mégacaryocytaire. Les mégacaryocytes sont classiquement de grande taille, avec un noyau hyperlobulé et un cytoplasme mature. Ils sont répartis dans la moelle, bien que parfois rassemblés en amas de petite taille et assez lâches. Outre les marqueurs moléculaires qui seront abordés plus loin, le caractère primitif de la prolifération peut également être évalué par la mise en évidence de progéniteurs mégacaryocytaires spontanés bien que cela ne fasse pas partie des critères diagnostiques définis par l'OMS. (Dobo et al., 2004b; Arber et al., 2016)

Cliniquement, la TE reste généralement silencieuse, bien que parfois découverte sur des événements thrombo-emboliques ou hémorragiques. Des érythromélgies sont parfois observées. Une splénomégalie peut être retrouvée dans moins de la moitié des cas, les hépatomégalies étant plus rares (environ 20%). (Swerdlow et al., 2008; Thiele, 2009)

La TE est le SMP dont l'évolution est la plus indolente. Les patients présentent la meilleure espérance de vie des SMP (mais celle-ci reste légèrement inférieure à celle de la population normale, Hultcrantz et al., 2012), et l'évolution vers la myélofibrose ou la LAM est rare (risque de 2% à 15 ans, avec une médiane de survenue de 10-15 ans). Les principaux risques sont liés aux accidents thrombo-emboliques ou hémorragiques. Leur incidence est évaluée à 12 pour 1000 patients-années, et celles des transformations en myélofibrose et LAM respectivement à 1,6 et 1,2 pour 1000 patients-années. (Cervantes et al., 2008; Swerdlow et al., 2008; Thiele, 2009)

d. Myélofibrose Primitive

La MFP résulte d'une prolifération cellulaire portant sur les lignées mégacaryocytaire et granuleuse associée à un certain degré de fibrose médullaire ainsi qu'à des anomalies de maturation de la lignée plaquettaire. Elle est caractérisée par une évolution en deux phases : une phase initiale dite « pré-fibrotique » puis une phase fibrotique. Trente pourcents des

patients sont asymptomatiques au diagnostic, les autres pouvant présenter des symptômes altérant leur qualité de vie tels que fatigue, dyspnée, perte de poids, sueurs nocturnes, fièvre inexpliquée. (Swerdlow et al., 2008; Thiele, 2009) Une splénomégalie parfois massive est palpée chez 90% des patients (liée à l'hématopoïèse extramédullaire), une hépatomégalie dans 50% des cas. (Swerdlow et al., 2008) Au niveau sanguin, une érythromyélie et une anisopoikilocytose avec présence de dacryocytes sont fréquentes. Une circulation de cellules blastiques est fortement associée à la maladie et constitue un facteur pronostic péjoratif si le taux excède 1% des leucocytes. (Cervantes et al., 2009) Les patients présentent généralement une anémie d'intensité variable. L'histologie médullaire montre au cours de la phase cellulaire de la maladie une hypercellularité avec une prolifération portant principalement sur les lignées mégacaryocytaire et granulocytaire tandis que la lignée érythroblastique présente une tendance à l'hypoplasie. Par ailleurs les mégacaryocytes ont tendance à se regrouper en amas au niveau des régions endostéales et des sinus vasculaires. Une dysmégacaryopoïèse est habituellement observée associant un pléomorphisme avec des variations importantes de taille, des anomalies du rapport nucléocytoplasmique (signe d'altération de leur maturation), un noyau hypolobulé et un hyperchromatisme nucléaire. (Thiele, 2009) Lors de l'évolution de la maladie vers la phase « fibrotique », une hypoplasie médullaire s'installe, le tissu hématopoïétique étant progressivement remplacé par des adipocytes et des dépôts de fibres de réticuline et de collagène apparaissent.

La médiane de survie à la phase fibrotique est estimée à 4-5,5 ans (correspondant à une réduction de l'espérance de vie de 30% environ). La MFP est donc associée au plus mauvais pronostic des SMP Ph-négatifs. (Cervantes et al., 2008; Swerdlow et al., 2008) Les causes de morbi-mortalité sont l'insuffisance médullaire, les thromboses ou hémorragies, les transformations en LAM (20% de transformation à 10 ans). Notons que la survie des MF post-TE est comparable à celle des MFP. (Cervantes et al., 2008)

Les principales données présentées ci-avant sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Présentation clinico-biologique des syndromes myéloprolifératifs classiques

Pathologie	Lignée(s) cellulaire(s) principalement affectée(s)	PNN	Myélemie	PNEo	PNB	Hb	Plq	Manifestations cliniques possibles (autres que splénomégalie)	Splénomégalie (% des cas)	Médiane de survie (années)*
LMC	Granuleuse	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	N ou ↓	N ou ↑	Thrombose, Hémorragies, Signes généraux	75	5 (en absence de traitement)
PV	Erythrocytaire	N ou ↑	0	N	N	↑↑↑	↑	Hyperviscosité, Thrombose, Prurit	70	13,5
TE	Mégacaryocytaire	N ou ↑	0	N	N	N	↑↑↑	Thrombose, Hémorragie	< 50	19,8
MFP phase cellulaire	Granuleuse et mégacaryocytaire	↑↑	↑↑	N	N	N	↑↑	Signes généraux	90	15-17
MFP phase fibrotique	Granuleuse et mégacaryocytaire	N ou ↓	↑↑↑	N	N	↓↓↓	N ou ↓	Signes généraux, Insuffisance médullaire	100	4-6

PNN : Polynucléaires neutrophiles, PNEo : Polynucléaires éosinophiles, PNB : Polynucléaires basophiles, Hb : Hémoglobine, Plq : Plaquettes, N : normal, ↑ : discrètement augmenté, ↑↑ : modérément augmenté, ↑↑↑ : très augmenté, ↓ : discrètement diminué, ↓↓↓ : très diminué, 0 : absence, Signes généraux : perte de poids, fièvre, sueurs, Hyperviscosité : céphalées, vertiges, troubles visuels, Insuffisance médullaire : pâleur, asthénie, hémorragie, infections. * (d'après Swerdlow et al., 2008; Tefferi et al., 2014e)

B. Physiopathologie :

La physiopathologie des SMP reste encore à ce jour incomplètement comprise. Cependant, de grands progrès ont été réalisés cette dernière décennie dans la compréhension des mécanismes oncogéniques de ces maladies.

a. Anomalies cytogénétiques

Le bilan diagnostique des hémopathies malignes fait souvent intervenir une étude cytogénétique, des anomalies chromosomiques pouvant expliquer l'oncogenèse de certaines hémopathies, au premier rang desquelles la LMC, mais aussi certaines LA ou certains syndromes myélodysplasiques (SMD).

Comme précédemment évoqué, la LMC est caractérisée par la translocation $t(9;22)(q34;q11)$ conduisant à la génération du chromosome Philadelphie. Cette translocation aboutit à la production du transcrit de fusion BCR-ABL1 responsable de la maladie. (Daley et al., 1990)

Au cours des PV et TE, les patients présentent rarement des anomalies cytogénétiques (respectivement 11-15% et 7% des patients). Les anomalies les plus fréquemment décrites sont les trisomies 8 et 9, les délétions du bras long du chromosome 20 ($del(20q)$) ainsi que les anomalies du chromosome 1. Ces anomalies pourraient être associées à un pronostic défavorable (Tang et al., 2017) bien que ces données restent à confirmer (Gangat et al., 2008, 2009) Elle ne sont cependant pas spécifiques de ces maladies en dehors des trisomies 9 qui se voient principalement dans les PV et certaines MFP JAK2 mutées.

La MFP se démarque des deux autres SMP Ph-négatifs typiques par une plus grande fréquence des anomalies chromosomiques (30-40% des patients au diagnostic), essentiellement représentées par les $del20q$, $del13q$ et anomalies du chromosome 1, les trisomies 8 et 9 étant également fréquentes. A noter que le caryotype des patients présentant des MF post-PV est plus fréquemment anormal que ce qui est rapporté dans les MFP et PV (60-90% des cas) ce qui n'est pas le cas des MF post-TE (30-40%). De plus, contrairement aux PV et TE, un impact pronostique péjoratif sur la survie a été démontré pour certaines anomalies, incitant certains auteurs à intégrer ces données dans le calcul du score

pronostique DIPSS-plus. De plus, un caryotype défavorable selon les critères du DIPSS-plus prédit un risque accru de transformation en LAM. (Gangat et al., 2011)

Ainsi, mis à part le chromosome Philadelphie, les différentes anomalies cytogénétiques décrites ne permettent pas d'expliquer la physiopathologie des SMP classiques.

b. Anomalies moléculaires

La compréhension des mécanismes physiopathologiques des SMP a fait un bond en avant lors de la découverte des anomalies moléculaires impliquées. L'activité constitutive des protéines de fusion BCR-ABL1 ou celles impliquant les récepteurs au Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Gotlib, 2014) ou encore les mutations du récepteur c-KIT (Tefferi et al., 2008) étaient autant d'exemples de l'implication des tyrosine kinases dans l'oncogenèse des SMP. Toutefois, au cours des PV, TE et MFP, aucune protéine de fusion n'a été mise en évidence. Mais l'activation des voies de signalisation, et notamment de la voie JAK2-STAT5 semblait indiquer que ces maladies, comme les autres SMP, étaient des « maladies des kinases ». (Ugo et al., 2004)

- *JAK2V617F*

La découverte de la mutation *JAK2V617F* (Janus kinase) en 2005 par l'équipe de W. Vainchenker constitue une étape marquante dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des SMP Ph-négatifs. (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005)

La famille JAK se compose de 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Ces tyrosine kinases s'associent au domaine cytosolique des récepteurs aux cytokines. Elles présentent dans leur partie C-terminale deux domaines homologues, le domaine JH1 (*JAK Homologous*) portant l'activité kinase et un domaine pseudokinase JH2 catalytiquement inactif, mais qui exerce une régulation négative sur l'activité kinase du domaine JH1. (Saharinen and Silvennoinen, 2002) A la partie N-terminale, les domaines JH5-JH7 contiennent des motifs FERM-like (Band-4.1, Ezrin, Radixin, et Moesin) permettant l'interaction avec le domaine cytosolique des récepteurs auxquels ces protéines sont associées.

Ces tyrosine kinases sont associées aux :

- récepteurs homodimériques « myéloïdes » : récepteurs à
 - l'érythropoïétine (EPO)
 - la TPO
 - au *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF)
- récepteurs à la prolactine et l'hormone de croissance
- récepteurs hétérodimériques :
 - récepteurs de la famille IL-3R partageant la chaîne commune β
 - IL-3-R
 - *Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) - GM-CSF-R
 - IL-5-R
 - récepteurs de la famille gp130
- récepteur R2 à l'interféron γ . (Vainchenker et al., 2011)

La mutation *JAK2V617F* correspond à la transversion d'une guanidine (G) en Thymidine (T) en position 1849 au niveau de l'exon 14, responsable de la substitution de la valine en position 617 par une phénylalanine. (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005) Or cette valine est prédite comme participant à une interface entre les domaines JH1 et JH2. (Saharinen and Silvennoinen, 2002) Sa substitution par une phénylalanine entraîne ainsi la perte de l'inhibition exercée par le domaine JH2 sur le domaine kinase. *JAK2V617F* est ainsi capable de déclencher un SMP *via* l'activation dérégulée de l'activité tyrosine kinase de JAK2 indépendamment de la liaison d'un ligand sur l'un des récepteurs auquel elle est associée (EPO-R, MPL, IL3-R ou CSF3R). (Figure 16, Vainchenker et al., 2011) Ceci conduit à une croissance cellulaire indépendante des facteurs de croissance et à une augmentation de la survie cellulaire. (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Kralovics et al., 2005)

Les mutations *JAK2V617F* sont retrouvées dans 95% des PV et dans 50-60% des cas de TE et MFP. (Figure 16, Tefferi et al., 2009a) Elles sont également détectées dans 30-50% des thromboses des veines splanchniques (Kiladjian et al., 2008a; Smalberg et al., 2012) et des SMD/SMP avec excès de sidéroblastes en couronne et thrombocytose (MDS/MPN-RS-T). (Renneville et al., 2006; Steensma et al., 2006; Wang et al., 2006) Elles ont également été décrites au cours des LMMC, des mastocytoses, des LCN et des SHE avec une fréquence bien

moindre. (Jelinek et al., 2005; Jones et al., 2005; Steensma et al., 2005)

Le fait que cette mutation soit retrouvée au cours de maladies au phénotype différent reste à ce jour incomplètement expliqué. L'une des hypothèses proposées est que les PV et TE seraient une même entité dont le phénotype est déterminé par la charge mutationnelle *JAK2V617F*. Un continuum entre ces maladies serait ainsi observé, certains patients présentant une TE et une mutation *JAK2V617F* pouvant évoluer vers une PV. (Rumi et al., 2013) Le modèle proposé comporterait deux étapes. Dans un premier temps l'apparition de la mutation *JAK2V617F* donnerait naissance à un clone hétérozygote prenant l'avantage sur l'hématopoïèse physiologique. Dans un second temps, une recombinaison mitotique permettrait la duplication de l'allèle muté et l'élimination de l'allèle sauvage. Le clone homozygote ainsi généré acquerrait alors un avantage prolifératif sur le clone hétérozygote et pourrait s'expandre aux dépens de ce dernier. L'acquisition de cette homozygotie associée à l'expansion du clone homozygote déterminerait ainsi la transition d'un stade « TE » vers une maladie de type « PV ». (James et al., 2005; Kralovics et al., 2005; Baxter et al., 2005) Ce modèle est reflété par les charges mutationnelles chez les patients. Elles sont globalement faibles au cours des TE, plus importantes au cours des MFP et des PV et augmentent lors de la transformation des PV et TE en MF. (Larsen et al., 2007; Lippert et al., 2006) Par ailleurs, des modèles murins semblent indiquer qu'une faible charge allélique *JAK2V617F* est associée à un phénotype proche de la TE tandis qu'une charge plus importante induit une maladie plus proche de la PV. (Akada et al., 2010; Tiedt et al., 2008)

D'autres facteurs comme le sexe, le type de cellule dans laquelle la mutation apparaît ou encore d'autres facteurs génétiques ou épigénétiques sont également évoqués comme modulateurs du phénotype des SMP Ph-négatifs. (James, 2008)

- *JAK2 exon 12* :

L'étude de patients atteints de PV mais ne présentant pas la mutation *JAK2V617F* a permis d'identifier d'autres mutations de *JAK2* survenant au niveau de l'exon 12 et non de l'exon 14. (Scott et al., 2007) Au contraire de *JAK2V617F*, ces mutations ne surviennent qu'au cours des PV. (Figure 16, Scott et al., 2007; Pietra et al., 2008) Elles consistent en des mutations ponctuelles ou des insertions et/ou délétions. (Kouroupi et al., 2008; Passamonti et al., 2011; Percy et al., 2007; Pietra et al., 2008; Scott et al., 2007; Williams et al., 2007) La prévalence de ces mutations dans la PV est estimée à 1,9-4,1% des patients. (Passamonti et

al., 2010; Williams et al., 2007) Ainsi, *JAK2* est muté chez virtuellement tous les patients atteints de PV, c'est pourquoi la présence d'une mutation de *JAK2* est actuellement considérée comme un critère diagnostique majeur pour cette maladie. (Arber et al., 2016; Tefferi et al., 2007)

Comme *JAK2V617F*, les mutations de l'exon 12 induisent une prolifération cellulaire indépendante des cytokines consécutive à une activation de la voie JAK2-STAT5, mais avec une signalisation plus intense, expliquant pourquoi seul le phénotype polyglobulique est associé à ces anomalies. (Figure 16, Scott et al., 2007)

Cliniquement et biologiquement, ces patients présentent essentiellement une polyglobulie (isolée dans 2/3 des cas, Passamonti et al., 2011) parfois accompagnée d'une thrombocytose et/ou hyperleucocytose restant plus modérées qu'en cas de mutation *JAK2V617F*. Leur taux d'EPO est souvent abaissé et la culture de progéniteurs érythroïdes EPO-indépendants habituellement positive. (Kouroupi et al., 2008; Passamonti et al., 2011; Percy et al., 2007; Pietra et al., 2008; Scott et al., 2007; Williams et al., 2007) Ces patients sont généralement plus jeunes que ceux présentant une mutation *JAK2V617F* (Kouroupi et al., 2008; Scott et al., 2007) et présentent une polyglobulie plus importante. Leur histologie médullaire révèle généralement une moelle hypercellulaire en lien avec une hyperplasie érythroïde. (Scott et al., 2007; Percy et al., 2007; Passamonti et al., 2011) Le pronostic, les complications thrombotiques et les transformations en MF ou LAM sont comparables aux PV *JAK2V617F* positives. (Passamonti et al., 2011) Ces mutations ne semblent par ailleurs pas associées aux thromboses splanchniques. (Kouroupi et al., 2008)

- *MPL exon 10* :

Découvertes dans les SMP par Pikman *et al.*, les mutations affectant le récepteur de la thrombopoïétine sont retrouvées au cours de 4-10,6% des MFP et 1-4,1% des TE. (Figure 16, Pikman et al., 2006; Pardanani et al., 2006; Vannucchi et al., 2008; Guglielmelli et al., 2007; Schnittger et al., 2009; Beer et al., 2008) Ces mutations n'ont pas été identifiées dans les PV, les SMD, les LMMC ou les LAM *de novo*. (Pardanani et al., 2006) Elles surviennent au niveau de l'exon 10, et plus précisément du résidu 515 localisé à la jonction domaine cytoplasmique-domaine transmembranaire, important pour l'activation du récepteur. (Pikman et al., 2006) Les deux mutations les plus fréquentes sont les W515L et W515K. Plus rarement les mutations W515A et W515R peuvent être observées. (Schnittger et al., 2009) La mutation

S505N précédemment associée aux thrombocytoses familiales (Ding et al., 2004; Liu et al., 2009) peut également être retrouvée au cours de SMP sporadiques. (Beer et al., 2008)

Les mutations *MPLW515* confèrent aux cellules qui les acquièrent une croissance indépendante des cytokines, une hypersensibilité à la TPO et une activation constitutive de JAK2, STAT3, STAT5, AKT et ERK (Figure 16). Cette signalisation reste sensible à l'action des inhibiteurs de JAK2. (Pikman et al., 2006) Ces mutations peuvent être retrouvées à l'état hétérozygote ou homozygote, plus fréquemment pour la mutation W515K que la mutation W515L dans ce dernier cas. (Beer et al., 2008; Guglielmelli et al., 2007; Pardanani et al., 2006; Schnittger et al., 2009; Vannucchi et al., 2008) L'homozygotie *MPLW515* reste toutefois beaucoup plus rare que dans le cas de *JAK2V617F*.

L'hypothèse d'une association avec une prolifération essentiellement mégacaryocytaire peut être émise. En effet, les patients mutés pour *MPL* présentent habituellement des taux d'hémoglobine moindres que les autres et une thrombocytose plus importante a été observée au cours des TE comparativement aux patients présentant la mutation *JAK2V617F*. De plus il semble exister au niveau médullaire une hypocellularité notamment érythroïde par rapport aux patients non mutés pour *MPL*. Enfin, ces patients ne présentent pas de colonies érythroïdes endogènes contrairement aux cas mutés *JAK2V617F*. (Vannucchi et al., 2008; Guglielmelli et al., 2007; Beer et al., 2008; Chaligné et al., 2007; Pardanani et al., 2007)

Cliniquement, l'impact sur le risque thrombotique reste controversé (une augmentation du risque de thromboses artérielles ou veineuses a été observée dans certaines études). (Beer et al., 2008; Vannucchi et al., 2008) Ces mutations pourraient par ailleurs être associées à une augmentation des manifestations liées aux troubles microcirculatoires au cours des TE. (Rotunno et al., 2013; Vannucchi et al., 2008) Aucun impact sur la survie ou le risque de transformation n'a pu être mis en évidence. (Beer et al., 2008; Vannucchi et al., 2008)

- *Autres mutations de JAK2 et de MPL :*

La mise en œuvre de techniques de séquençage d'exome entier a permis la découverte récente chez certains patients atteints de SMP de mutations affectant d'autres régions de *JAK2* et de *MPL* que celles évoquées précédemment. Pour certaines d'entre elles, la mise en évidence d'un effet fonctionnel (en terme de prolifération) a pu être démontrée. Cependant

leur effet semble plus faible que celui des mutations « classiques ». (Cabagnols et al., 2016; Milosevic Feenstra et al., 2016)

En définitives, les différentes mutations dites « initiatrices » des SMP (y compris les mutations de *calréticuline* qui seront détaillées plus loin) sont responsables d'une activation constitutive des voies de signalisation associées aux récepteurs aux cytokines : JAK-STAT, MAPK, PI3K-AKT. (Figure 16A) La fréquence de ces différentes mutations dans les PV, TE et MFP est par ailleurs indiquée dans la Figure 16B.

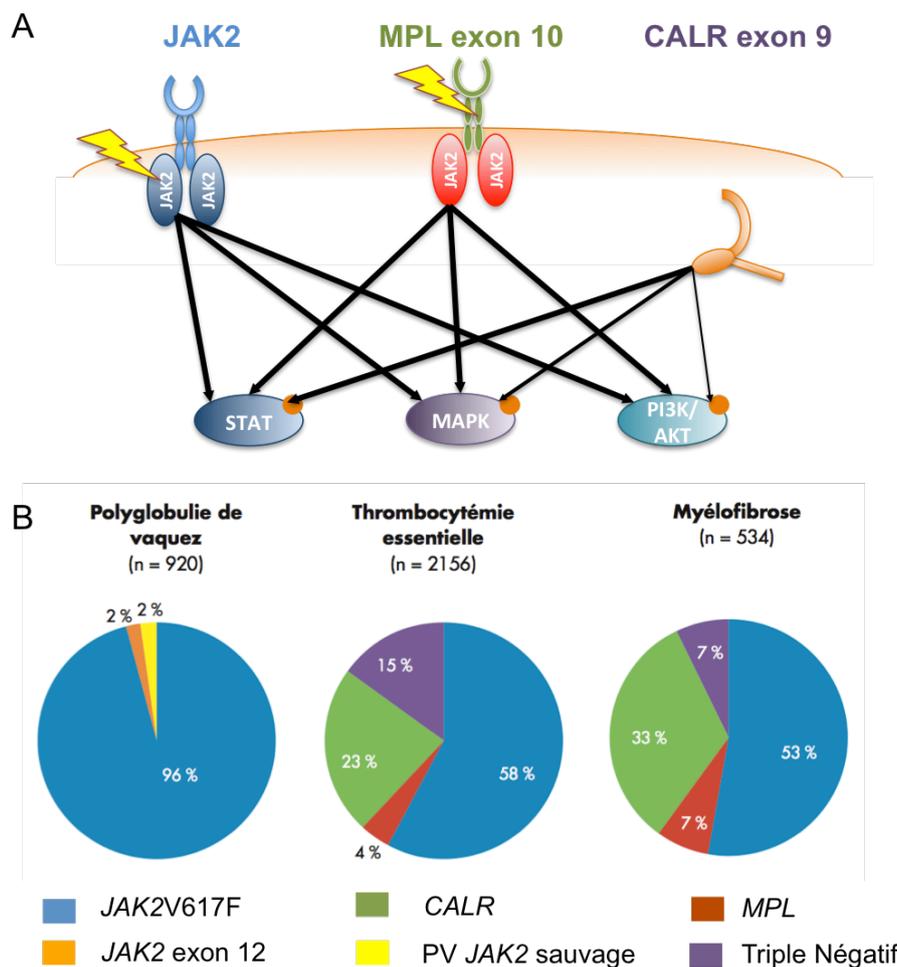


Figure 16 : Physiopathologie associées aux mutations initiatrices des SMP et fréquence au cours des différentes maladies

(A) Les mutations initiatrices de SMP affectant la tyrosine kinase JAK2, le récepteur à la TPO (MPL) et la calréticuline (CALR) sont à l'origine d'une activation constitutive des voies de signalisation JAK-STAT, MAPK et PI3K/AKT. L'intensité de la signalisation déclenchée est représentée par l'épaisseur du trait. (d'après Vainchenker and Kralovics, 2017) (B) Fréquence des mutations de JAK2, MPL et CALR au cours des PV, TE et MFP. (Chauveau et al., 2014)

- *Autres mutations :*

Si les mutations impliquant les voies de signalisation des récepteurs aux cytokines ont fait la preuve de leur implication dans la physiopathologie des SMP, notamment par le développement de maladies similaires dans divers modèles murins, des mutations affectant d'autres processus ont également été identifiées au cours de ces maladies. Les principales impliquent des gènes :

- de l'épigénétique : *TET2*, *IDH1/2*, *EZH2*, *ASXL1*, *DNMT3A* (Abdel-Wahab et al., 2011a, 2011b; Brecqueville et al., 2011; Delhommeau et al., 2009; Ernst et al., 2010; Gelsi-Boyer et al., 2012; Green and Beer, 2010; Guglielmelli et al., 2011; Pardanani et al., 2010a; Stegelmann et al., 2011; Stein et al., 2011; Tefferi et al., 2009b, 2010)
- de la machinerie d'épissage : *U2AF1*, *SF3B1* et *SRSF2* (Lasho et al., 2012b, 2012a; Tefferi et al., 2014a)
- des régulateurs de la signalisation cellulaire : *CBL*, *LNK* ou *SH2B3* (Aranaz et al., 2012; Gery et al., 2009; Grand et al., 2009; Lasho et al., 2010; Pardanani et al., 2010b; Schnittger et al., 2012)

Des délétions d'*IKZF1* (Jäger et al., 2010) ou de *TP53* (Beer et al., 2010; Harutyunyan et al., 2011) ont également été rapportées.

Toutefois, ces mutations sont également mises en évidence au cours d'autres hémopathies (notamment SMD et LA) et peuvent être associées aux mutations initiatrices. Par ailleurs, certaines sont peu fréquentes dans les SMP et sont essentiellement associées aux formes avancées de la maladie (transformation en MF ou LA). Leur implication dans le phénotype « myéloprolifératif » reste donc peu probable.

c. Prédisposition aux SMP

Si la plupart des cas de SMP sont sporadiques, des cas familiaux ont été rapportés, suggérant l'existence de facteurs prédisposant à l'acquisition des mutations responsables de ces maladies. (Bellanné-Chantelot et al., 2006) La mise en évidence qu'au moins 2,8% des patients acquéraient au moins deux fois la mutation *JAK2V617F* suggérait par ailleurs une prédisposition à l'acquisition de cette mutation. (Olcaydu et al., 2009a)

Parmi les facteurs prédisposants associés au risque de développement d'un SMP,

différents polymorphismes ont pu être découverts. Le premier facteur découvert porte sur le gène JAK2 lui-même. Il consiste en un haplotype (donc plutôt une association de polymorphismes) dénommé 46/1 qui est associé à l'acquisition d'une mutation JAK2V617F et au développement d'un SMP. (Jones et al., 2009; Kilpivaara et al., 2009; Olcaydu et al., 2009a) Cet haplotype est également associé aux cas de PV mutés sur l'exon12 de JAK2 et les SMP mutés pour MPL ou non mutés pour JAK2 et MPL. (Jones et al., 2010; Olcaydu et al., 2009b) Par la suite, d'autres polymorphismes portant notamment sur les gènes MECOM, TERT, HBS1L/MYB et RBBP6 ont également été associés aux SMP. (Harutyunyan et al., 2016; Tapper et al., 2015) Une amplification conduisant à la surexpression d'ATG2B et de GSKIP a par ailleurs récemment été associée au développement d'hémopathies malignes (dont des SMP) au sein de familles antillaises. (Saliba et al., 2015)

III. Un nouvel acteur dans les SMP, le réticulum endoplasmique

Après la découverte des mutations JAK2V617F et JAK2 exon 12, la quasi-totalité des cas de PV avait trouvé leur explication physiopathologique. Toutefois, 30-35% des TE et MFP ne présentant ni la mutation JAK2V617F ni de mutation de MPL n'avaient pas de base moléculaire connue jusqu'à la découverte en décembre 2013 des mutations du gène de la calréticuline (CALR).

1. Calréticuline et hémopathies non-SMP

Des altérations d'expression de CALR sont largement documentées dans des tumeurs solides. (Gold et al., 2010; Zamanian et al., 2013) La première association de CALR avec une hémopathie maligne a porté sur l'étude de modèle de LAM exprimant les protéines de fusion CBFβ-MYH11 et AML1-MDS1-EVI1. Leur expression est associée à l'induction de l'expression de CALR qui à son tour inhibe l'expression et l'activité du facteur de transcription C/EBP-α, participant ainsi au blocage de maturation des blastes. (Helbling, 2005; Helbling et al., 2004)

Plus récemment, l'expression de CALR à la surface des cellules de LMC, de LAM, de LAL, de SMD ou de lymphomes a été mise en évidence. (Chao et al., 2010; Pang et al., 2013) Cette expression n'est pas liée à une apoptose, mais pourrait être la conséquence d'un stress du RE comme cela a été montré dans les LAM. (Fucikova et al., 2016) Comme indiqué précédemment, l'expression de CALR à la surface des cellules constitue un signal favorisant leur phagocytose. Les cellules malignes échappent à cette destinée en exprimant à leur surface le CD47. (Chao et al., 2010; Pang et al., 2013)

L'intérêt pour l'étude de CALR dans les hémopathies malignes vient surtout de la découverte récente de mutations de ce gène observées spécifiquement dans les SMP.

2. Les mutations de calréticuline dans les SMP :

A. Fréquence

Les mutations de CALR ont été découvertes par deux équipes européennes en décembre 2013. (Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013) Elles constituent la 2ème mutation la plus fréquente au cours des SMP Ph-négatifs (derrière JAK2V617F et devant celles de TET2). (Nangalia et al., 2013) De plus, ces mutations sont associées spécifiquement aux maladies présentant une prolifération du compartiment mégacaryocytaire et affectent environ 25-30% des cas de TE et 20-30% des cas de MFP. (Rumi et al., 2013; Rotunno et al., 2013; Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013; Tefferi et al., 2014b, 2014c, 2014d) Si l'on ne considère que les cas non mutés pour JAK2 ou MPL, cette proportion monte à 60-70% pour les TE et 60-80% pour les MFP. Cette découverte diminue à 8-10% la proportion de patients pour lesquels aucune mutation « initiatrice » n'est mise en évidence (ces cas sont maintenant désignés comme « triple négatifs »). (Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013)

Ces mutations ont également été recherchées au cours d'autres hémopathies et n'ont pas été retrouvées dans les PV, les LMC et les autres SMP. (Chauveau et al., 2017; Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013) Nangalia et al. avait initialement observé des mutations de CALR au cours de 8% des SMD (Nangalia et al., 2013), mais d'autres études semblent indiquer une fréquence plus faible dans ces maladies, de l'ordre de 0-3,4%. (Broséus et al., 2014; Hou et al., 2014; Klampfl et al., 2013; Patnaik et al., 2014) La fréquence des mutations de CALR semble également faible au cours des syndromes frontières SMP/SMD tels que les SMP/SMD-RS-T (fréquence d'environ 1%, Broséus et al., 2014) ou les LMMC (fréquence de 0-3%, Hou et al., 2014; Nangalia et al., 2013). Elles n'ont par ailleurs pas été observées au cours des LAM de novo, des tumeurs lymphoïdes, des cancers solides. (Nangalia et al., 2013)

Comme JAK2V617F, les mutations de CALR semblent également survenir au cours de certaines formes moins classiques de SMP, telles que

- les formes pédiatriques : 0-34% des TE (Giona et al., 2014; Langabeer et al., 2014), 50% des MFP (An et al., 2014)
- les formes familiales (Lundberg et al., 2014; Maffioli et al., 2014; Rumi et al., 2014a)

- les thromboses splanchniques (mais avec une fréquence plus anecdotique que *JAK2V617F*). (Haslam and Langabeer, 2014; Turon et al., 2014)

Le gène *CALR* est localisé sur le bras court du chromosome 19 et est constitué de 9 exons. Les mutations de *CALR* dans les SMP surviennent exclusivement au niveau de l'exon 9. Il s'agit d'insertions et/ou délétions à l'origine d'un décalage du cadre de lecture d'une paire de bases (pb). Ceci conduit à la modification du domaine C de la protéine qui devient alors basique (et donc chargé positivement) et à la perte du motif KDEL. (Figure 17 et Figure 18, Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013)

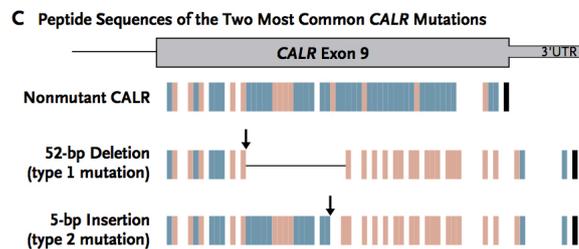


Figure 17 : Représentation schématique de la séquence peptidique des 2 mutations de *CALR* les plus fréquentes.

Chaque barre représente un acide aminé. Les barres bleues désignent les acides aminés acides, les barres roses-oranges les acides aminés basiques et les barres noires les codons stop. Les délétions et insertions de l'exon 9 de *CALR* conduisent à une modification importante de la charge des résidus terminaux (Klampfl et al., 2013).

A ce jour plus d'une cinquantaine de mutations différentes sont décrites dans la littérature, mais les deux mutations les plus fréquentes (c.1099_1150del, p.L367fs*46, désignée comme la mutation de type 1 et c.1154_1155insTTGTC, p.K385fs*47 désignée comme type 2) représentent 80-85% des cas. La mutation de type 1 correspond à une délétion de 52 pb, conduisant au remplacement de la quasi-totalité des résidus chargés négativement par des résidus chargés positivement. Elle représente environ 45-50% des cas totaux et est significativement plus fréquente dans les MFP que dans les TE. (Rumi et al., 2013; Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013) La mutation de type 2 correspond à une insertion de 5 pb et conduit à une modification moins importante du domaine C que la mutation de type 1. Elle représente environ 30-40% des cas de TE et 10-20% des cas de MFP. (Rumi et al., 2013; Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013) La fréquence des autres mutations ne dépasse pas 2% des cas. (Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013) Cependant, toutes les mutations de

CALR observées dans ces maladies conduisent à la génération d'une protéine comportant les mêmes 36 derniers acides aminés (Figure 18). Ces mutations sont exclusives des mutations JAK2V617F et MPLW515 (à de rares exceptions près) et sont généralement observées à l'état hétérozygote. (Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013)

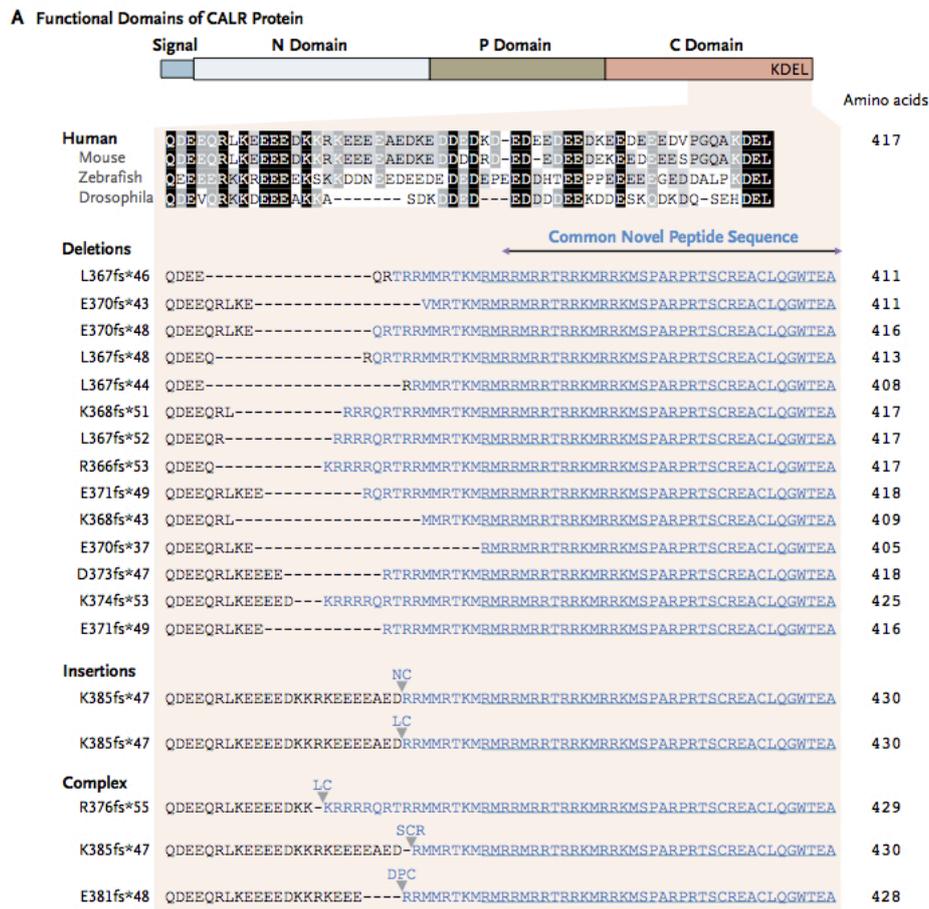


Figure 18 : Séquence peptidique de certaines mutations de CALR

Toutes les insertions et délétions conduisent au même décalage du cadre de lecture et à la génération d'une séquence commune terminale de 36 acides aminés, ainsi qu'à la perte du motif KDEL. (Nangalia et al., 2013)

D'autres « mutations » de CALR ont par ailleurs été mises en évidence. Il existe chez certains individus des délétions respectant le cadre de lecture (délétions d'un multiple de 3 paires de bases). Pour certaines d'entre elles, le caractère germinal a pu être démontré, (Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013) suggérant l'absence de rôle de ces variants dans la physiopathologie des SMP. (He et al., 2015) Par ailleurs, des mutations ponctuelles de CALR ont été retrouvées dans des SMP (Jeromin et al., 2016; Klampfl et al., 2013; Lasho et

al., 2014; Lim et al., 2015) ainsi que dans des cas de lymphome. (Green et al., 2013) Les modifications qu'elles induisent au niveau protéique étant très différentes de celles induites par les mutations classiquement identifiées dans les SMP, leur rôle dans la physiopathologie des maladies dans lesquelles elles ont été identifiées reste peu probable.

B. Particularités clinico-biologiques et pronostic

Que ce soit dans les TE ou les MFP, les mutations de CALR sont associées à une présentation clinico-biologique distincte et un pronostic favorable par rapport à la mutation JAK2V617F.

Au cours des TE, les mutations de CALR sont associées à un âge plus jeune et une représentation masculine plus importante par rapport aux cas mutés JAK2V617F. (Rotunno et al., 2013; Rumi et al., 2013; Tefferi et al., 2014c) Par ailleurs, la prolifération semble plus spécifiquement atteindre la lignée mégacaryocytaire puisque les patients présentent une thrombocytose plus marquée et des taux d'hémoglobine et de leucocytes moindres que les patients mutés JAK2V617F. (Rumi et al., 2013; Rotunno et al., 2013; Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013; Tefferi et al., 2014c, 2014e) Toutefois, quelques différences pourraient distinguer les mutations de type 1 et de type 2. Les premières seraient prédominantes chez les hommes tandis que les secondes intéresseraient des patients plus jeunes et présentant une thrombocytose plus importante. (Andrikovics et al., 2014; Cabagnols et al., 2014; Elala et al., 2016; Tefferi et al., 2014d; Trifa et al., 2014) En terme pronostique, les patients atteints de TE et mutés sur CALR ont un risque thrombotique diminué par rapport aux patients mutés JAK2V617F (y compris dans les cas familiaux). (Rumi et al., 2013; Rotunno et al., 2013; Klampfl et al., 2013; Tefferi et al., 2014c; Rumi et al., 2014a; Tefferi et al., 2014e, 2014d; Elala et al., 2016) Aucune différence en terme de survie ou de risque de transformation en LA n'a été mise en évidence. (Rumi et al., 2013; Rotunno et al., 2013; Tefferi et al., 2014c, 2014d, 2014e; Elala et al., 2016) Un sur-risque de transformation en MF a été observé dans trois études seulement. (Andrikovics et al., 2014; Nangalia et al., 2013; Pietra et al., 2016) Ces différentes données sont résumées dans le Tableau 2.

Dans les MFP, les patients présentant des mutations de CALR sont statistiquement plus jeunes que les patients présentant la mutation JAK2V617F. Ils présentent habituellement une leucocytose moindre, une thrombocytose plus importante ainsi qu'une moins grande

fréquence d'anémie, d'hyperleucocytose et de thrombopénie par rapport aux patients porteurs de la mutation JAK2V617F. (Klampfl et al., 2013; Rumi et al., 2014b; Tefferi et al., 2014f, 2014b, 2014e) Par ailleurs, les mutations de CALR ont un impact pronostique favorable dans les MFP puisque les patients mutés sur ce gène présentent une survie globale plus longue, y compris en cas d'allogreffe de moelle osseuse. (Andrikovics et al., 2014; Guglielmelli et al., 2014; Klampfl et al., 2013; Panagiota et al., 2014; Rumi et al., 2014b; Tefferi et al., 2014f, 2014b, 2014e) Là encore, un effet différentiel entre mutations de type 1 et mutations de type 2 pourrait exister. Le bénéfice en terme de survie pourrait n'intéresser que les mutations de type 1 (et mutations apparentées). (Pietra et al., 2016; Tefferi et al., 2014g) Ces données restent cependant à confirmer puisqu'une étude française a montré des résultats inverses. (Cabagnols et al., 2014) Différents travaux ont par ailleurs déterminé que les patients « triple-négatifs » présentaient le pronostic le plus défavorable y compris dans les cas familiaux et en cas d'allogreffe. (Tefferi et al., 2014b, 2014e; Rumi et al., 2014a; Panagiota et al., 2014) Ces différentes informations sont résumées dans le Tableau 3.

Tableau 2 : Association des mutations de *CALR* à une présentation clinico-biologique spécifique dans les thrombocythémies essentielles

TE									
	Age	Sexe ratio	Plaquettes	Hb	Leucocytes	Thrombose	Transformation en MF	Transformation en LA	Survie globale
Klampfl <i>et al.</i>, 2013	NP	NP	↑	↓	↓	↓	NP	NP	↑
Nangalia <i>et al.</i>, 2013	=	=	↑	↓	↓ (NS)	=	↑	NP	=
Rumi <i>et al.</i>, 2013	↓	↑	↑	↓	↓	↓	=	=	=
Rotunno <i>et al.</i>, 2013	↓	↑	↑	↓	↓	↓	=	=	=
Tefferi <i>et al.</i>, 2014c	↓	↑	↑	↓	↓	↓	=	=	=
Tefferi <i>et al.</i>, 2014d	↓	↑	↑	↓	↓	↓	=	NP	NP
Tefferi <i>et al.</i>, 2014f	↓	↑	↑	↓	↓	↓	=	=	=
Andrikovics <i>et al.</i>, 2014	↓	↑ (NS)	↑	↓	↓	↓	↑	=	=
Elala <i>et al.</i>, 2016	↓	↑	↑	↓	NS	↓	=	=	=
Pietra <i>et al.</i>, 2016	↓	NP	↑	↓	↓ (type 2 like)	↓ (type 2 like)	↑ (type 2 like)	=	=

Les informations indiquées dans ce tableau résument les conclusions issues de différentes études concernant les patients dont le gène *CALR* est muté comparativement aux patients porteurs de la mutation *JAK2V617F*. TE : Thrombocythémie essentielle, NP : Non Précisé, ↑ : paramètre augmenté, ↓ : paramètre diminué, = : absence de différence, (NS) : Non significatif dans l'étude, (type-2 like) : conclusion associée seulement aux mutations de type 2 et mutations apparentées

Tableau 3 : Association des mutations de *CALR* à une présentation clinico-biologique spécifique dans les myélofibrose primitives.

MFP									
Age	Plaquettes	Leucocytose	Hb / Anémie	Thrombocytose	Thrombopénie	Score pronostique	Transformation en LA	Survie globale	
Klampfl et al., 2013	NP	↓	NP	NP	NP	NP	NP	↑	↑
Nangalia et al., 2013	=	↓ (NS)	=	NP	NP	NP	=	=	=
Tefferi et al., 2014b	↓	↓	↓	↑	↓	↓	=	↑	↑
Tefferi et al., 2014e	↓ (T1)	↓ (T1)	↓	↑ (T1)	↓ (T1)	↓ (T1)	ND	↑ (T1)	↑ (T1)
Tefferi et al., 2014g	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓ si <i>ASXL1</i> non muté	↑	↑
Tefferi et al., 2014f	↓	↓	NP	↑	NP	NP	↓	↑	↑
Andrikovics et al., 2014	↓	=	=	NP	NP	NP	=	↑	↑
Guglielmelli et al., 2014	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	↑	↑
Rumi et al., 2014a	↓	↓	↓	↑	↓	↓	=	↑ (NS)	↑ (NS)
Pietra et al., 2016	↓ (T1 like)	↓ (T1 like)	=	NP	NP	=	=	↑ (T1 like)	↑ (T1 like)

Les informations indiquées dans ce tableau résument les conclusions issues de différentes études concernant les patients dont le gène *CALR* est muté comparativement aux patients porteurs de la mutation *JAK2V617F*. MFP : Myélofibrose Primitives, NP : Non Précisé, ↑ : paramètre augmenté, ↓ : paramètre diminué, = : absence de différence, Plaquettes : taux de plaquettes circulant, Leucocytose : Taux de leucocytes circulants ou fréquence d'hyperleucocytose, Hb/Anémie : taux d'hémoglobine ou fréquence d'une anémie, Thrombocytose : fréquence de thrombocytose ; Thrombopénie : fréquence de thrombopénie, Score pronostique : score déterminé selon l'IPSS ou le DIPSS-plus, (NS) : Non significatif dans l'étude, (T1) et (T1 like) : conclusion associée seulement aux mutations de type 1 et mutations apparentées

3. Eléments de physiopathologie

A. *Calréticulines mutées : des lectines anormales*

Dès leur découverte, il a été démontré que les mutations de *CALR* étaient capables de favoriser une prolifération cellulaire en absence de cytokine, suggérant un rôle initiateur du phénotype myéloprolifératif pour ces mutations. (Klampfl et al., 2013) Leur implication dans le développement des SMP a par la suite été démontrée dans différents modèles murins. Marty *et al.* et Elf *et al.* ont ainsi présenté des expériences de greffes de cellules exprimant des protéines *CALR* mutantes après transduction virale. Dans la première étude, les souris recevant des cellules exprimant les protéines mutantes développaient une maladie comparable à une TE, évoluant par la suite en myélofibrose dans le cas des mutations de type 1. (Marty et al., 2016) Elf *et al.* ont ensuite confirmé que les mutations de *CALR* étaient suffisantes pour déclencher un SMP mimant une TE, sans toutefois retrouver d'évolution en myélofibrose. (Elf et al., 2016) Dans les 2 études, les mutations ont été associées à un avantage prolifératif au niveau du compartiment mégacaryocytaire, associé à un avantage au niveau du compartiment cellules souches/progéniteurs précoces dans le cas du variant de type 1 uniquement. (Elf et al., 2016; Marty et al., 2016) Une troisième étude basée sur un modèle transgénique murin a finalement confirmé que l'expression des mutants de *CALR* conduisait au développement d'une maladie de type TE. (Shide et al., 2016) Dans ce modèle, aucune évolution en myélofibrose n'a été relevée. Notons cependant qu'aucun modèle *knock in* permettant une expression des variants de *CALR* à des taux physiologiques n'a été publié à ce jour. Néanmoins ces différentes données concordent avec les résultats suggérant la présence de ces mutations au niveau des cellules souches des patients et leur apparition précoce au cours de la maladie. (Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013) La présence de ces mutations au niveau des cellules souches est également confirmée par leur possible mise en évidence chez les patients au niveau de toutes les lignées hématopoïétiques. (El-Khoury et al., 2016)

Une activation de la voie JAK2-STAT5 en lien avec l'expression de *CALR* mutante a rapidement été démontrée sur un modèle de lignée hématopoïétique murine, les BaF3. (Klampfl et al., 2013) L'activation de cette voie de signalisation et l'indépendance (ou hypersensibilité) vis-à-vis des cytokines à laquelle elle est associée ont par la suite été confirmées, notamment sur d'autres modèles cellulaires : UT-7 (lignée humaine) transduites

et lignées humaines et murines éditées par technologie CRISPR. (Araki et al., 2016; Balligand et al., 2016; Elf et al., 2016; Nivarthi et al., 2016; Shide et al., 2016) Ainsi, bien que non impliquées directement dans la signalisation des récepteurs aux cytokines, les mutations de *CALR* semblent donc mettre en jeu des mécanismes oncogéniques similaires aux mutations *JAK2V617F* et *MPLW515*. Ces données concordent par ailleurs avec les résultats de transcriptomique rapportant une activation de cette voie de signalisation chez les patients mutés pour *CALR*. (Rampal et al., 2014) Outre la voie JAK-STAT, d'autres voies de signalisation sont également mises en jeu, principalement la voie des MAPK, et dans une bien moindre mesure la voie PI3K-AKT. (Araki et al., 2016; Chachoua et al., 2016; Kollmann et al., 2017; Marty et al., 2016) L'activation de la voie des MAPK semble participer à l'avantage en terme de différenciation mégacaryocytaire conféré par les mutations de *CALR*. (Kollmann et al., 2017) Notons que ces effets fonctionnels sont bien le fait d'un gain de fonction lié à la nouvelle séquence du domaine C puisque la délétion de l'exon 9 n'est pas associée à quelque effet fonctionnel que ce soit. (Chachoua et al., 2016; Marty et al., 2016) Ces données sont cohérentes avec le fait que les mutations retrouvées chez les patients génèrent de manière constante une même séquence de 36 acides aminés au niveau terminal des protéines mutées, et l'absence de mutation tronquant la protéine sauvage.

Cependant, le pouvoir oncogénique associé aux mutations de *CALR* diffère de celui associé à la mutation *JAK2V617F* dans la mesure où celui-ci s'exprime uniquement au niveau de cellules exprimant MPL. (Araki et al., 2016; Chachoua et al., 2016; Elf et al., 2016; Marty et al., 2016) Aucun effet fonctionnel (phosphorylation de STAT5 ou prolifération en absence de cytokine) n'est observé en présence d'autres récepteurs aux cytokines, notamment avec le récepteur à l'érythropoïétine pourtant proche de MPL en terme de structure. (Chachoua et al., 2016; Elf et al., 2016; Marty et al., 2016) Une (petite) exception a cependant été observée pour le récepteur au G-CSF, dont il a été démontré qu'il pouvait déclencher une activation de STAT5 en présence de *CALR* mutée, sans toutefois permettre une indépendance des cellules vis-à-vis des cytokines (Chachoua et al., 2016; Marty et al., 2016). Cette association nécessaire avec MPL explique la spécificité de prolifération sur le compartiment mégacaryocytaire observée *in vitro* et *in vivo* et suggérée par la présentation biologique des patients au diagnostic.

Si les mécanismes précis d'activation de la signalisation initiée par MPL en présence des mutants de *CALR* restent à déterminer précisément, quelques informations ont déjà été

avancées. La première donnée importante est l'interaction physique spécifique qui existe entre les CALR mutantes et le récepteur MPL. Ainsi seules les protéines CALR mutées interagissent avec MPL. (Araki et al., 2016; Elf et al., 2016; Marty et al., 2016) Par contre, la spécificité d'interaction de ces protéines envers le récepteur MPL reste discutée : Araki *et al.* rapportent l'existence d'une interaction entre CALR mutées et récepteurs à l'érythropoïétine et au G-CSF, tandis que Elf *et al.* ne la retrouvent pas. Cependant, une interaction avec ce dernier est probable puisque Chachoua *et al.* ont mis en évidence une activation de la voie JAK2-STAT lorsque les CALR mutantes étaient exprimées conjointement avec le récepteur au G-CSF. Au niveau de MPL, seule la partie extracellulaire est nécessaire à l'interaction avec les CALR mutées. Plus particulièrement, cette liaison nécessite les sites de glycosylation de MPL (principalement le plus distal). Au niveau de CALR, ce sont les sites d'interaction avec les glycans présents au niveau du domaine N (notamment la phénylalanine 106 et l'aspartate 135) qui assurent l'interaction. Notons que cette liaison se fait indépendamment du site de liaison de MPL à la TPO. La liaison de CALR à MPL stabiliserait ainsi une conformation du récepteur associée à l'activation d'une signalisation. Cette liaison serait également associée avec une altération du trafic de MPL dans la voie de sécrétion, puisqu'elles sont associées à une augmentation de la proportion de MPL présentant des motifs glycans immatures (non édités dans le Golgi, Chachoua et al., 2016) Les effets de l'expression des mutants de CALR sur l'expression de MPL à la surface des cellules restent également discutés. (Araki et al., 2016; Balligand et al., 2016) Néanmoins plusieurs équipes ayant observé une atténuation de la réponse à la TPO en présence de CALR mutée, on peut imaginer que cet effet soit lié à une moindre présence de son récepteur à la surface des cellules. (Balligand et al., 2016; Marty et al., 2016; Shide et al., 2016)

Les raisons de cette interaction aberrante CALR mutée-MPL ont été étudiées. Le modèle proposé par Araki *et al.* est le suivant. Dans la calréticuline sauvage, l'interaction entre le domaine N de CALR et MPL est inhibée par le domaine P. Cette inhibition est par contre levée en présence de la nouvelle séquence du domaine C générée par les mutations. (Araki et al., 2016) Elf *et al.* ont de plus mis en évidence que cette propriété du domaine C muté n'était pas liée directement à une séquence en acides aminés spécifique, mais aux multiples charges positives créées par les mutations. En effet, le remplacement de tous les résidus non chargés par des glycines ne modifie pas le pouvoir oncogénique des protéines. (Elf et al., 2016) Ceci concorde avec le fait que des mutations de la calréticuline murine (del52, ins5 et del61) sont capables d'induire une activation du récepteur MPL humain et ce

malgré une séquence différente de leurs homologues humains. (Balligand et al., 2016)

B. Autres hypothèses

a. Impact sur la signalisation calcique

L'une des deux grandes fonctions de la calréticuline étant d'assurer un rôle de tampon calcique, la question de l'impact des mutations de CALR sur la signalisation associée à cet élément était légitime, d'autant plus que ces mutations perturbent directement les résidus impliqués dans cette fonction. A ce jour, une seule étude s'est intéressée à cette hypothèse. Celle-ci a montré que les mutations associées à la conservation du minimum de résidus chargés négativement (dénommées mutations type 1-like) augmentaient l'amplitude de la libération du calcium depuis le RE, ainsi que l'influx de calcium dans les cellules à partir du milieu extracellulaire. Les autres mutations qui conservent plus de résidus chargés négativement (et donc encore capables de lier le calcium) ne semblent pas perturber de manière significative la signalisation calcique. (Pietra et al., 2016) Dans les expériences *in vitro* présentées dans le paragraphe précédent, l'intensité de signalisation en aval de MPL ne différait pas entre les mutations de type 1 et de type 2. Il est donc possible que les différences phénotypiques observées entre ces 2 mutations chez les patients d'une part, et dans les modèles murins d'autre part, soient liées à cet effet différentiel sur la signalisation calcique.

b. Rôle paracrine

Devant le rôle de la calréticuline dans la voie de sécrétion des glycoprotéines et l'importance des cytokines dans la régulation de l'hématopoïèse, quelques équipes se sont intéressées à rechercher un effet paracrine qui pourrait participer au pouvoir oncogénique associé aux mutations de CALR. Si les mutations de CALR de type 1 semblent favoriser la sécrétion de diverses cytokines (principalement GM-CSF, IL-10, IL-12, MIP-1 α et MIP-1 β), les mutations de type 2 ne sont pas associées au même profil sécrétoire (elles stimulent principalement la sécrétion d'IL-7 et de MIG). (Garbati et al., 2016) Cependant, cette étude ne s'est intéressée qu'à la sécrétion de cytokines par des monocytes purifiés à partir de prélèvements de patients présentant une mutation de CALR ou conditionnés par du

surnageant de cellules HeLa transfectées avec différentes formes de CALR. L'étude du sécrétome des cellules hématopoïétiques présentant des caractéristiques mégacaryocytaires aurait probablement été plus appropriée pour évaluer ces aspects physiopathologiques. Néanmoins, la co-culture d'UT-7 non modifiées et d'UT-7 exprimant la forme mutée type 2 de CALR ne semble pas favoriser la croissance des premières en présence ou en absence d'apport exogène de TPO. (Araki et al., 2016) De la même manière, l'adjonction de concentrés de surnageants de cellules 32D exprimant la mutation de type 1 de CALR ne permet pas de rendre indépendantes aux cytokines des cellules exprimant la forme sauvage de CALR. (Han et al., 2016) Ce mode d'action paracrine s'il existe ne semble donc pas majeur dans la physiopathologie des SMP associée aux mutations de CALR.

c. Phagocytose

Etant donné le rôle de l'expression de CALR à la surface des cellules dans la phagocytose, et suivant l'hypothèse selon laquelle la perte du motif KDEL dans les protéines mutantes affecte leur localisation, une association entre mutations de CALR et sensibilité différentielle à la phagocytose a été recherchée. Si certains groupes ont suggéré une augmentation de l'expression de CALR mutée à la surface des cellules (Araki et al., 2016; Vainchenker, 2016) la sensibilité des cellules à la phagocytose ne semble pas modifiée par les mutations de CALR. (Daitoku et al., 2016)

4. Recherche des mutations de *CALR* et quantification des charges alléliques

A. Intérêt de la quantification des charges alléliques dans les SMP : l'expérience *JAK2V617F*

Dès la description des mutations *JAK2V617F*, des profils variés ont été observés, certains patients présentant une disparition quasi complète de l'allèle sauvage, tandis que d'autres semblaient porter la mutation avec une charge plus faible. (James et al., 2005) Des études ultérieures ont indiqué que les différents SMP étaient associés à des charges alléliques variables. La moitié des patients ayant une PV ou une MFP se présentent ainsi avec une charge mutationnelle supérieure à 50%, alors que la plupart des cas de TE présentent des charges inférieures à 50%. (Larsen et al., 2007; Lippert et al., 2006) La détermination des charges alléliques au diagnostic permet ainsi de différencier les types de SMP. Ce paramètre

peut également apporter une valeur pronostique : les patients polyglobuliques avec les charges JAK2V617F les plus élevées évoluent plus volontiers vers une myélofibrose et présentent un risque de thrombose plus important. Dans les TE, les fortes charges alléliques JAK2V617F prédiraient également un risque thrombotique majoré. (Vannucchi et al., 2007) Au contraire dans les MFP, un pronostic péjoratif est associé aux charges alléliques les plus faibles. (Guglielmelli et al., 2009)

Outre la caractérisation des patients au diagnostic, la détermination de la charge allélique est intéressante pour suivre l'efficacité des traitements proposés aux patients. Le médicament le plus efficace à ce jour pour réduire la taille du clone malin est l'interféron $\alpha 2a$ dont il a été montré qu'il pouvait induire des rémissions moléculaires. (Kiladjian et al., 2008b) De la même manière, les allogreffes de moelle osseuse, seul traitement potentiellement curateur, s'accompagnent d'une diminution drastique de la charge mutationnelle JAK2V617F. Les patients pour lesquels la mutation reste détectable à un taux supérieur à 1% un mois après la greffe sont à plus haut risque de rechute. Une surveillance rigoureuse des patients permet ainsi de guider les interventions par exemple en réalisant des injections de lymphocytes du donneur. (Kröger et al., 2009; Lange et al., 2013)

B. Techniques de détection des mutations de CALR

Depuis la découverte des mutations de CALR, différentes techniques ont été développées afin de permettre leur détection chez les patients. Si le séquençage « classique » de type Sanger permet d'emblée d'identifier la mutation portée par les patients, il présente de nombreuses contraintes en termes de coût, de temps ainsi qu'une faible sensibilité (estimée à 10-20% en général). Le séquençage à haut débit (qui a permis l'identification de ces mutations) permet de gagner en terme de sensibilité de détection, (Jeromin et al., 2016) mais les différentes technologies existantes n'étant pas forcément très adaptées à la détection de mutations de type insertions/délétions et leur application restant restreinte à des laboratoires très spécialisés, leur utilisation en pratique courante reste très limitée. Différentes méthodes de criblage ont ainsi été développées. Une première technique est l'HRM (High Resolution Melting), basée sur l'analyse à haute résolution du profil de dénaturation des amplicons. (Chi et al., 2014; Lim et al., 2015) Celle-ci ne permet cependant pas d'identifier les variants non pathologiques de CALR (délétions conservant le cadre de lecture), ni d'estimer la charge allélique des mutations. L'analyse de fragment consiste à réaliser une PCR « classique », si ce

n'est que l'une des amorces utilisées est marquée par un fluorochrome. Les amplicons sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire afin de déterminer leur taille. Cette méthode est celle décrite dans la publication de Klampfl et al. Rapportée par la suite dans différentes études, son utilisation est largement répandue dans les laboratoires hospitaliers. (Rumi et al., 2013; Klampfl et al., 2013; Broséus et al., 2014; Langabeer et al., 2014) Cette technique présente l'avantage d'estimer la charge allélique à partir des aires sous les pics d'électrophorégramme. Pour ces deux approches cependant, la confirmation du type de mutation nécessite la mise en œuvre d'un séquençage.

Du fait de l'expérience acquise avec JAK2V617F, différentes équipes ont souhaité développer des techniques permettant d'évaluer plus précisément la charge allélique. Certaines sont basées sur le principe de la PCR en temps réel. (Kjær et al., 2016; Zinke et al., 2015) Une autre approche est basée sur le principe de la PCR digitale. (Anelli et al., 2016; Badbaran et al., 2016; Mansier et al., 2016) Celle-ci correspond à la réalisation d'une PCR en point final réalisée après partitionnement de l'échantillon. La quantification (absolue) est alors obtenue en dénombrant le nombre de partitions où une amplification est détectée. (Vogelstein and Kinzler, 1999)

C. Etude des charges alléliques CALR et corrélations clinico-biologiques

A ce jour, peu de travaux se sont intéressés à l'étude des charges alléliques CALR. Plusieurs équipes ont rapporté des charges alléliques significativement supérieures aux charges JAK2V617F. En fait, ce qui frappe le plus est une certaine homogénéité des valeurs observées pour les mutation de CALR comparativement à JAK2V617F. Ainsi, les charges mutationnelles CALR sont rarement inférieures à 10%, et excèdent exceptionnellement 50%. (Andrikovics et al., 2014; Cabagnols et al., 2014; Jeromin et al., 2016) En ce qui concerne les MFP, les résultats sont encore plus regroupés, la quasi-totalité des cas présentant une charge allélique de 50%. (Andrikovics et al., 2014; Cabagnols et al., 2014) Dans ces conditions, la recherche d'une corrélation entre charge mutationnelle et phénotype paraît plus compliquée qu'avec les mutations de JAK2. Cependant, il semblerait que les patients présentant des charges alléliques plus faibles aient une leucocytose et une thrombocytose moindre, alors que leur taux d'hémoglobine serait supérieur. (Andrikovics et al., 2014) Par ailleurs, les patients atteints de TE et présentant une charge allélique faible (<10%) seraient quant à eux plus jeunes. (Jeromin et al., 2016) Ces données n'ont toutefois jamais été confirmées.

Comme pour JAK2V617F, la quantification de la charge allélique des mutations de CALR constitue également un bon moyen d'évaluer la réponse aux traitements. Il a ainsi été démontré qu'un traitement par interféron ou une allogreffe de moelle osseuse pouvait s'accompagner d'une diminution de la charge voire d'une disparition de la mutation. (Cassinat et al., 2014; Haslam et al., 2014; Verger et al., 2015)

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Rapidement après la découverte des mutations de *CALR*, nous avons souhaité apporter notre contribution à la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui leur sont associés. Une approche assez globale a été envisagée, afin de caractériser ces mutations d'abord sur un plan translationnel, mais également dans des aspects plus fondamentaux.

Forts de notre expertise sur la quantification des charges alléliques *JAK2V617F*, la question d'une caractérisation fine des patients présentant une mutation de *CALR* en terme de charge mutationnelle nous a semblé intéressante. Nous avons pour ce faire développé un outil précis et sensible permettant de rechercher et quantifier précisément la charge allélique des mutations de type 1 et de type 2 *CALR*. La technique de PCR digitale que nous avons mise au point s'est également révélée être un outil utile pour l'étude des propriétés des protéines mutantes (voir en dessous).

Concernant les aspects fondamentaux, nous avons voulu tirer parti de l'association des compétences de notre équipe, spécialisée dans l'étude des syndromes myéloprolifératifs, et de celle du Dr Eric Chevet, référente dans l'étude de la biologie du réticulum endoplasmique. Le projet avait initialement pour but de déterminer l'impact de l'expression des protéines mutées sur l'homéostasie du RE. Nous souhaitons notamment déterminer l'implication du stress du RE dans le développement des maladies associées à ces mutations ou encore évaluer leur impact sur la synthèse des glycoprotéines sécrétées et membranaires. Cependant, dès nos premières études protéiques, nous avons constaté la très faible expression des protéines mutantes dans les différents modèles exploités (lignées cellulaires et prélèvements primaires de patients). L'absence de défaut transcriptionnel ayant été écarté par la quantification des charges alléliques *CALR* sur ARN par PCR digitale, nous avons exploré l'hypothèse d'une dégradation des protéines dans les cellules. Cette hypothèse s'étant révélée exacte, la compréhension des mécanismes impliqués dans ce processus nous a paru importante tant pour évaluer son rôle dans le développement des SMP, que pour proposer une approche thérapeutique intéressante en modulant ce phénomène.

Enfin, dans le but de renforcer l'association de ces mutations avec la prolifération portant spécifiquement sur le compartiment mégacaryocytaire, nous avons recherché les effets de la différenciation vers ce lignage sur les niveaux d'expression des protéines CALR mutantes.

ARTICLES ET TRAVAUX

ARTICLES ET TRAVAUX

I. Article 1

Quantification of the mutant *CALR* allelic burden by digital PCR: application to minimal residual disease evaluation after bone marrow transplantation.

Olivier Mansier, Marina Migeon, Arnaud Saint-Lézer, Chloé James, Emmanuelle Verger, Marie Robin, Gérard Socié, Audrey Bidet, François-Xavier Mahon, Bruno Cassinat, Eric Lippert.

Soumis à Journal of Molecular Diagnostics en juillet 2015

Accepté le 22 juillet 2015

Publié en janvier 2016

1. Synthèse de l'article

Deux techniques de quantification des mutations de CALR ont été développées dans notre équipe. La première, utilisée en routine, est l'analyse de fragments. Celle-ci consiste en une réaction de PCR en point final dans laquelle l'une des amorces porte un fluorochrome. La taille des amplicons est ensuite déterminée par électrophorèse capillaire. La proportion des différents amplicons peut alors être estimée à partir des aires sous les pics leur correspondant. Afin de disposer d'une technique plus sensible et plus précise, une quantification des mutations de type 1 et de type 2 par PCR digitale a été développée. La PCR digitale consiste en la réalisation d'une PCR en point final après partitionnement de l'échantillon. Dans le cas de la PCR digitale développée par BioRad, ce partitionnement est obtenu en réalisant la réaction en émulsion. L'échantillon est ainsi emprisonné dans des gouttelettes d'huiles dans lesquelles l'amplification de la cible se fait de manière indépendante. L'application d'une loi de poisson permet alors une quantification absolue du nombre de copies de la cible à partir du nombre de partitions dans lesquelles une amplification a été obtenue.

Bien que réalisable aussi bien sur ADN que sur ARN, il est habituel en pratique courante de déterminer les charges mutationnelles à partir d'ADN, moins sujet à des dégradations. Cette pratique permet d'estimer la taille du clone malin. L'utilisation d'ARN (non recommandée pour le diagnostic ou le suivi des patients) a quant à elle 2 buts potentiels : évaluer les niveaux d'expression des formes sauvages et mutées, et éventuellement gagner en sensibilité.

Dans un premier temps, nous avons déterminé les performances analytiques des 2 techniques développées. Dans nos mains, l'analyse de fragments présente respectivement une sensibilité de 3% et 1,5% pour les mutations de type 1 et 2 avec une variabilité relativement importante, particulièrement pour les faibles charges. Comme attendu, la sensibilité de la quantification par PCR digitale est bien supérieure, permettant la détection de mutations présentes à très faible niveau (0,025% pour les 2 mutations). La précision de la quantification est également bien améliorée avec cette technique comparativement à l'analyse de fragments.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé les résultats obtenus par les 2 méthodes sur les mêmes échantillons. Ceci nous a permis de démontrer que la technique d'analyse de

fragments a tendance à sur-estimer les charges alléliques < 50% et sous-estimer les charges > 50%, alors que la PCR digitale ne semble pas présenter de déviation par rapport aux valeurs théoriquement attendues.

Enfin, l'intérêt de la quantification des charges alléliques *CALR* par PCR digitale dans le suivi des patients a été démontré pour le cas des allogreffes de moelle osseuse dans le cadre de myélofibroses. Comme précédemment rapporté, les charges mutationnelles diminuent fortement après allogreffe, devenant parfois indétectables. Pour l'un des 4 patients étudiés, la mutation est réapparue à un taux très faible, détectable uniquement par PCR digitale. Ceci a précédé une rechûte quelques temps après. De manière prospective, on aurait pu envisager une modulation de l'immunothérapie, voire une réinjection des lymphocytes du donneur pour éviter cette rechute.



Quantification of the Mutant *CALR* Allelic Burden by Digital PCR



Application to Minimal Residual Disease Evaluation after Bone Marrow Transplantation

Olivier Mansier,^{*†} Marina Migeon,^{*} Arnaud Saint-Lézer,[‡] Chloé James,^{*§} Emmanuelle Verger,[¶] Marie Robin,^{||} Gérard Socié,^{||} Audrey Bidet,^{*} François-Xavier Mahon,^{*†} Bruno Cassinat,[¶] and Eric Lippert^{*†}

From the Hematology Laboratory,^{*} CHU de Bordeaux, Bordeaux; the Leukemic Hematopoiesis and Therapeutic Targets Laboratory,[†] Biothérapie des maladies génétiques et cancers, Université de Bordeaux, Bordeaux; the Service of Blood Diseases,[‡] CHU de Bordeaux, Bordeaux; the Cardiovascular Adaptation to Ischemia,[§] Université de Bordeaux, Bordeaux; the Cell Biology Service,[¶] Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris; and the Hematology Transplants Service,^{||} Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

Accepted for publication
July 22, 2015.

Address correspondence to Eric Lippert, M.D., Ph.D., Service d'Hématologie Biologique, CHRU de Brest, Bld Tanguy Prigent, 29609 Brest, France. E-mail: eric.lippert@univ-brest.fr

With the recent discovery of *CALR* mutations, >80% of patients with myeloproliferative neoplasms carry a phenotype-driving mutation. For *JAK2 V617F*, the most frequent mutation in myeloproliferative neoplasms, accurate determination of mutational loads is of interest at diagnosis, for phenotypic and prognostic purposes, and during follow-up for minimal residual disease assessment. We developed a digital PCR technique that allowed the accurate determination of *CALR* allelic burdens for the main mutations (types 1 and 2). Compared with the commonly used fluorescent PCR product analysis, digital PCR is more precise, reproducible, and accurate. Furthermore, this method reached a very high sensitivity. We detected at least 0.025% *CALR* mutants. It can thus be used for patient characterization at diagnosis and for minimal residual disease monitoring. When applied to patients with primary myelofibrosis who underwent hematopoietic stem cell transplant, the digital PCR detected low levels of minimal residual disease. After negatization of the mutational load in all patients, the disease reappeared at a low level in one patient, preceding hematologic relapse. In conclusion, digital PCR adapted to type 1 and 2 *CALR* mutations is an inexpensive, highly precise, and sensitive technique suitable for evaluation of myeloproliferative neoplasm patients during follow-up. (*J Mol Diagn* 2016, 18: 68–74; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.07.007>)

Philadelphia chromosome–negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) are characterized by an excessive proliferation of hematopoietic cells consecutive to the clonal acquisition of a phenotype-driving mutation. More than 95% of patients with polycythemia vera (PV), 60% to 70% with essential thrombocytemia (ET), and 50% to 60% with primary myelofibrosis (PMF) harbor a G1849T (V617F) mutation of the *JAK2* gene.^{1–3} Many *JAK2 V617F*–negative PVs carry a mutation in the exon 12 of *JAK2*,⁴ whereas the gene encoding for the *JAK2*-coupled thrombopoietin receptor *MPL* is found mutated in 5% to 10% of ET or PMF patients.⁵ Recently, recurrent mutations

in the *CALR* gene were discovered in most *JAK2* and *MPL* nonmutated ET and PMF patients.^{6,7} In addition to better understanding the pathophysiology of MPN, the discovery of these mutations has provided very useful clonal markers for the diagnosis of MPN.

Supported by Cancéropole Grand Sud Ouest grant 2014-E02, La Ligue Contre le Cancer, Comité Aquitaine Charentes, grant 15-33, and a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (O.M.).

Disclosures: None declared.

Current address of E.L., Service d'Hématologie Biologique, CHRU de Brest, Brest, France.

Further characterization of the diseases has been permitted by the accurate assessment of the mutational burden, especially for the *JAK2 V617F* mutation. For instance, it has been rapidly recognized that the *JAK2 V617F* allelic burden is much higher in PV than in ET patients,² most of the latter having mainly heterozygously mutated cells.⁸ In addition, different levels of mutant allele burden have been associated with various outcomes,^{3,9,10} emphasizing the need for accurate and reproducible measurements of mutant allelic burdens. Last, these clonal markers can be used for disease burden assessments and monitoring the effect of some treatments. Interferon alpha has thus been found to efficiently decrease *JAK2 V617F* allelic burden in PV and ET patients, some of whom eventually reach a level undetectable by current techniques.¹¹ Hematopoietic stem cell transplant (HSCT) is equally able to strongly decrease *JAK2 V617F* levels, which can be used as a minimal residual disease (MRD) marker, the persistence of which predicts a higher risk of relapse.¹² In addition, the persistence or reappearance of the mutation can guide the modulation of the immunotherapy after HSCT to complete the molecular response.¹³ These elements make an accurate sensitive and reproducible technique for evaluation of mutant allelic burden extremely useful for characterization and monitoring of MPN patients.

Whereas the *JAK2 V617F* mutation affects a single nucleotide, mutations in the exon 9 of the *CALR* gene are more diverse. Most mutations are type 1 (45% to 53%), corresponding to a 52-bp deletion, or type 2 (32% to 41%), consisting of a 5-bp insertion.^{6,7} The primer-based allelic-specific PCRs that were the most reliable for *JAK2 V617F* mutations^{14,15} cannot be easily adapted for the quantification of the larger *CALR* mutations. This approach has been successfully used to quantify type 1 and type 2 mutations with a limit of detection of approximately 1%, a level that is suboptimal for MRD monitoring.¹⁶ However, this approach of allelic discrimination can reach a higher sensitivity in the context of digital PCR (dPCR). This technique relies on the fragmentation of the PCR reactions into very small droplets that are clonally analyzed.¹⁷ Thus, the quantification of the PCR results is based on the number of droplets positive for amplification of the wild-type or the mutant studied allele. This results in an absolute reliable and sensitive assessment of the mutational load.

Because all *CALR* mutations imply size variations (deletions and/or insertions), their detection and relative quantification are frequently performed using PCR fragment length analysis. These are typically achieved by capillary electrophoresis of end point PCR products and integration of the area under the peaks of the electropherograms. We compared the performances of fragment analysis to those of allelic discrimination using dPCR. We found that, even though both techniques are appropriate for routine analyses, the latter has a higher accuracy and lower detection threshold, making it a better tool for both characterization of patients and MRD monitoring.

Table 1 Primers and Probes

Application	Name	Sequence
<i>CALR</i> cloning, sequencing	CCF	5'-ATGCTAGCTGCCGGAGGGTCG-TTTTA-3'
	CCR	5'-ATACGCGTAGAGACATTATTT-GGCGCGG-3'
Evagreen plasmid quantification	TopoF	5'-ACACGTAGAAAGCCAGTCCG-3'
	TopoR	5'-TAAGCCCCTGCAAGCTACC-3'
Fragment analysis dPCR type 1	CFF	5'-GAGGTGTGTGCTCTGCCT-3'
	CFR	5'-AGAGACATTATTTGGCGCGG-3'
	CD1F	5'-CAGAGAAACAAATGAAGGAC-AAAC-3'
	CD1R	5'-GGACATCTTCCTCCTCATC-3'
	CD1PW*	5'-GGACGAGGAGCAGAGGCTTAAGGAGGA-3'
	CD1PM*	5'-GGACGAGGAGCAGAGGACAAG-GAGGA-3'
dPCR type 2	CD2F	5'-TGAAGGACAAACAGGACGAG-3'
	CD2R	5'-CCGGGACATCTTCCTCC-3'
	CD2PW*	5'-AGCAGAGGACAATTGTGCGGA-GGATGATGA-3'
	CD2PM*	5'-GAGGAGGAGGACAAGGAG-GATGATGA-3'

*Probes.

F, forward; M, mutant; dPCR, digital PCR; R, reverse; W, wild type.

Materials and Methods

Sample Preparation

DNA was obtained from granulocytes of patients with myeloproliferative disorders explored for the *CALR* mutation at the hematology laboratory of the CHU de Bordeaux or patients included in the JAKALLO clinical trial (<http://www.clinicaltrials.gov>; accession number NCT01795677). All patients had provided informed written consent in accordance with the Declaration of Helsinki for the use of the remaining DNA for investigational purposes. DNA was extracted using the QIAamp Blood DNA minikit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). As a means of developing standards for assessing the precision of the method, a sequence corresponding to exon 9 of *CALR* was amplified from patients with wild-type, type 1, or type 2 *CALR* mutations with primers CCF and CCR (Table 1) at 500 nmol/L and a mix that contained 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 1.25U GoTaq, and the provider's specific buffer (Promega France, Charbonnières, France), then cloned into the TopoTA vector (Life Technologies, Carlsbad, CA). The plasmid was quantified by an Evagreen-based ddPCR using primers specific for the plasmid backbone (TOPOR and TOPOF) (Table 1) at 130 nmol/L and the ddPCR QX200 Evagreen supermix. The PCR program was as follows: denaturation for 5 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 30-second denaturation (95°C) and 1-minute annealing/extension (60°C), then 5 minutes at 4°C and 5 minutes at 90°C. Total *CALR* gene copy numbers were also measured in

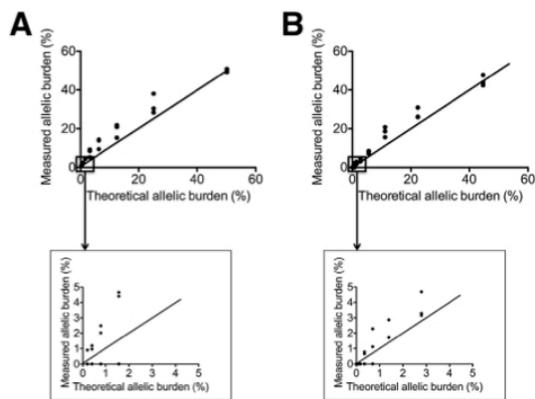


Figure 1 Sensitivity and accuracy of fragment analysis for *CALR* allelic burden assessment. Granulocyte DNA from patients with 50% *CALR* mutation type 1 (A) and type 2 (B) was diluted into normal DNA. Allelic burden was determined by fragment analysis after a 35-cycle PCR performed on 75 ng of DNA. Theoretical allelic burden was calculated by dividing mean allelic burden assessed on pure sample by the dilution factor. The **bottom panel** focuses on low mutational loads. Each point represents a replicate of three analyses.

control normal DNA with ddPCR using the CFF and CCR primers following the same protocol.

Fragment Analysis

For fragment analyses, a 298-bp PCR product was obtained for wild-type *CALR* after 30 to 35 cycles of amplification using 25 to 75 ng of genomic DNA and the primers CFF and CFR (Table 1), the latter 5'-labeled with fluorescein. The PCR mix using GoTaq was as described above. The PCR program consisted of a 2-minute denaturation at 95°C, 30 to 35 cycles of 45 seconds at 95°C, 1 minute at 60°C, and 2 minutes at 72°C followed by a final extension of 5 minutes at 72°C. After a 1:50 dilution of the PCR products into water, the peaks of wild-type and mutant *CALR* were resolved on a 3130 sequencer (ABI; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), and the ratios of mutant to total *CALR* were determined by measuring the areas under the peaks.

ddPCR

For the ddPCR, 25 to 250 ng of genomic DNA were mixed with primers and probes specific for either type 1 or type 2 mutation. In each case, the wild-type probes (CD1PW and CD2PW) (Table 1) were 5'-labeled with HEX (6-carboxy-2,4,4,5,7,7-hexachlorofluorescein succinimidyl ester) and the mutant probes (CD1PM and CD2PM) with FAM (6-carboxy-fluorescein); all had a 3'-BHQ quencher. The mix contained primers at 900 nmol/L each: wild-type and mutant probes at 250 nmol/L and the droplet ddPCR supermix for Probes (Biorad, Pleasanton, CA). The emulsion was prepared with the QX-100 (Biorad). The amplification program was as follows: 10-minute denaturation at 95°C, followed by 40 cycles of 30

seconds at 94°C, 1 minute at 63°C (type 1) or 64°C (type 2), and inactivation of 10 minutes at 98°C. The number of droplets positive for wild-type or mutant *CALR* was determined on the QX-200 droplet reader (Biorad) using the Qantasoft software version 1.5 (Biorad). A total of 10,000 to 18,000 droplets of 0.85 nL were analyzed in each well.

Limit of Quantification Analysis

Limit of quantification assessed using the blank samples was determined as three times the SD of *CALR* allelic burden assessed on 15 healthy control samples. Mean bias was determined as the mean difference between allelic burdens assessed by both evaluated techniques, and statistical significance was determined by Deming Regression using GraphPad Prism software version 5.0c (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences between techniques on patients' DNA were assessed by the Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Results

Quantification Using Fragment Analysis

To assess the accuracy and detection limit of fragment analysis, genomic DNAs from patients with 50% *CALR* mutant allelic burden (assessed by fragment length analysis and ddPCR) were diluted into DNA from healthy controls. With the use of 75 ng of matrix DNA, dilutions up to 1:16 for type 1 mutations and 1:32 for type 2 still produced a quantifiable peak, indicating a sensitivity of the technique of approximately 3% and 1.5%, respectively (Figure 1). At lower values, the mutant peaks were inconsistently detected. Interrun coefficients of variation varied from 1.7% at 50% allelic burden to 27.5% for lower values with type 1 mutants

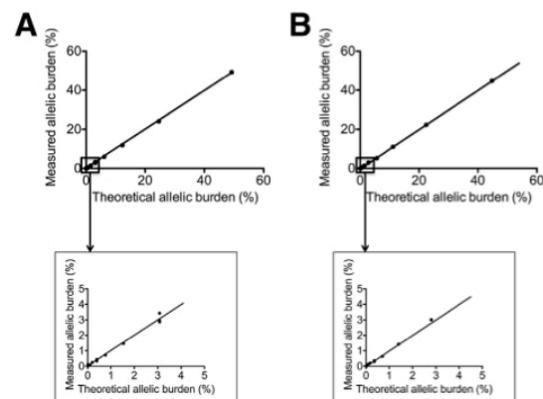


Figure 2 Sensitivity and accuracy of droplet digital PCR (ddPCR) for *CALR* allelic burden assessment. Granulocyte DNA from patients with 50% *CALR* mutation type 1 (A) and type 2 (B) was diluted into normal DNA. Allelic burden was determined by ddPCR using 75 ng of DNA. Theoretical allelic burden was calculated by dividing mean allelic burden assessed on pure sample by the dilution factor. The **bottom panel** focuses on low mutational loads. Each point represents a replicate of three analyses.

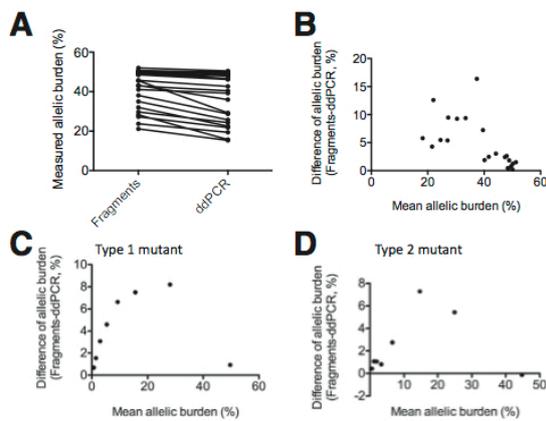


Figure 3 Comparison of allelic burdens determined by fragment analysis and droplet digital PCR (ddPCR) on patients' samples. Allelic burdens of *CALR* mutations were assessed by fragment analysis and ddPCR. **A:** The results obtained by the two techniques using primary patients' samples ($P < 0.0001$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test). Bland and Altman representation reveals the bias linked to fragment analysis compared to ddPCR with primary patients' samples (**B**) or DNA dilutions for type 1 (**C**) and type 2 (**D**) mutants.

and from 6% at 50% allelic burden to 26.6% for lower values of type 2 mutants.

However, with the use of these conditions optimized for the detection of low quantities of mutant DNA (75 ng of DNA, 35 PCR cycles), the measured allelic burdens were systematically overestimated by a factor as high as 145% for low allelic burdens when compared with theoretical values expected from the dilution factor, suggesting that the technique is suboptimal for accurate allelic burden estimation. To avail ourselves of a method able to both reliably quantify *CALR* mutant allelic burden and reach a lower limit of detection, we developed a ddPCR technique.

ddPCR for the Detection of Mutant *CALR*

The analysis of the serial DNA dilutions described above indicated that this technique is more sensitive than the fragment analysis. With the use of 75 ng of DNA, samples with 0.025% mutant *CALR* were systematically detected with a limit of quantification of 0.014% for type 1. The detection limit was equally low (0.025%) for type 2, with a limit of detection of 0% (no unspecific positivity) (Figure 2). In these conditions, the number of target copies per partition ranged from 1.34 to 2.5. To improve the sensitivity of the technique, up to 250 ng of genomic DNA per well was analyzed, but this resulted in an increased background with up to 1% false-positive droplets. Interrun coefficients of variation varied from 0.06% to 9.6% for type 1 and from 0.07% to 18.9% for type 2 mutants (depending on the level of allelic burden considered). The observed results were perfectly superimposable with theoretical values expected from the dilution process, suggesting that ddPCR

quantification is more accurate than that obtained with fragment analysis. Bland-Altman representations comparing ddPCR and fragment analysis with either dilutions of mutant into normal DNA or primary patients' samples with various levels of *CALR* mutants confirmed that fragment analysis systematically overestimated values between 1.5% and 35% (Figure 3) ($P < 0.0001$ for the difference between the two techniques).

Determination of Exact Values by Both Techniques

Depending on the PCR process, results obtained by fragment analysis can be different from those observed with ddPCR. However, exact evaluation of the allelic burden is critical for comparison of results generated by different laboratories. To ensure that the ddPCR values were the most reliable, defined numbers of copies of mutant plasmid DNA were diluted into equally known numbers of wild-type *CALR* genomic DNA copies, both determined by non-allele-specific ddPCR using Evagreen. Theoretical values were strictly superimposable with observed values, confirming the accuracy of the digital allelic discrimination (mean bias, -0.44% and -0.50% for type 1 and type 2 mutations, respectively; nonsignificant difference by Deming regression) (Figure 4). In contrast, we observed a systematic overestimation of values $<50\%$ and underestimation of values $>50\%$ for both mutant types when using fragment analysis (mean bias, 0.55% and 2.2% for type 1 and type 2 mutations, respectively, with a significant difference determined by Deming regression). To explain this, we reasoned that a saturation of the PCR and/or the peak

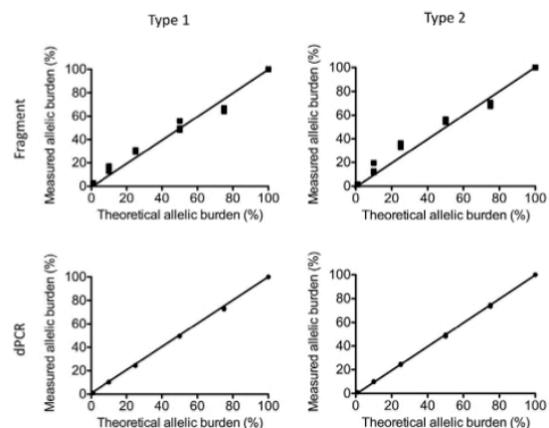


Figure 4 Reliability of allelic burden determined by fragment analysis and droplet digital PCR (ddPCR). Samples that contained known levels of mutant *CALR* were prepared by mixing plasmid DNAs with known copy numbers of mutant *CALR* and normal genomic DNA with known amounts of wild-type *CALR*, both independently determined by absolute quantification using a non-allele-specific Evagreen-based ddPCR. Allelic burden was assessed for each dilution with fragment analysis and ddPCR. The observed values (y axis) are compared with expected values (x axis) for type 1 or type 2 *CALR* mutations. Each point represents one of five (**top panels**) or two (**bottom panels**) independent experiments.

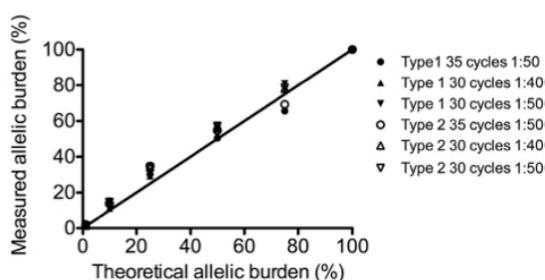


Figure 5 Fragment analysis accuracy in nonsaturating conditions. Samples that contained known levels of mutant *CALR* were prepared by mixing plasmid DNAs with known copy numbers of mutant *CALR* and normal genomic DNA with known amounts of wild-type *CALR*, both independently determined by absolute quantification using a non-allele-specific Evagreen-based ddPCR. Allelic burden was assessed for each dilution with fragment analysis after different PCR cycle numbers and different dilutions of the PCR product.

signals on electrophoresis may explain this discrepancy. To limit these effects, the numbers of PCR cycles was decreased to 25 or 30, and the dilutions of the PCR products were adjusted to obtain unsaturated peaks. These conditions did not improve significantly the accuracy of the quantification (Figure 5) but altered the limit of detection with dilutions at 3% rarely detectable, especially after 25 cycles of PCR.

Interest of ddPCR for MPN Patients' Characterization

DNA obtained from granulocytes of patients before and after having received an allogeneic HSCT for primary myelofibrosis were evaluated with the allele-specific ddPCR technique (Figure 6). The *CALR* allelic burden markedly decreased in all four tested patients. In all patients for whom a sample was harvested in the first month after the transplant (unique patient numbers 2, 3, and 4), a minimal signal was detected between 0.03% and 1.1%. Two of them (unique patient numbers 3 and 4) achieved a complete molecular response later. For UPN 1, first tested 4 months after the transplant, the first control had no residual disease. However, 2 months later, the disease reappeared (0.03%), which was indicative of a relapse that was confirmed on the following assessment.

Discussion

Beside the progress in knowledge of MPN pathophysiology, the discovery of *CALR* mutations has provided a very useful diagnostic marker for patients lacking *JAK2* or *MPL* mutations. Among the different techniques used for their detection, some do not assess the allelic burden (high-resolution melting curve analyses, Sanger sequencing), yet accurate allelic burden assessment in MPN patients can be of interest. This has been clearly shown for the *JAK2 V617F* mutation, the burden of which has been associated with specific biological features and evolutive risks. Today, only a few studies

have evaluated the impact of *CALR* mutation burden on the disease phenotype.^{18,19} These studies indicate that higher burdens correlate with anomalies of the blood cell counts (higher platelet and leukocyte counts, lower hemoglobin level) and with more advanced stages of their disease. Determining allelic burdens can also be useful when monitoring patients under treatment. *JAK2 V617F* can decrease and even become undetectable after treatment with interferon alpha or allogeneic stem cell transplant. This seems to also be the case for *CALR* mutations.^{20,21} In most studies of *CALR* mutations, the allelic burden was monitored by fragment length analysis. This technique has frequently been used for the purpose of quantifying relative amounts of size mutants compared with their wild-type allele. Indeed, it is simple, inexpensive, and relatively easy to develop. However, in our hands, care must be taken not to saturate fluorescence signals. Even in these conditions, the quantification accuracy remains suboptimal; moreover, the limit of detection of the technique is rather high, approximately 3%. This may not be an issue for routine screening because most patients with *CALR* mutations have ratios of 40% to 50% and rarely <10%, but it definitely becomes an issue when MRD is addressed. We therefore developed a quantitative assay for allelic burden determination of the 2 most frequent mutations present in 80% of *CALR*-mutated patients and compared its performances to those of fragment length analysis.

In our hands, fragment length analysis offers a sensitivity of 1.5% to 3%, which agrees with other studies.^{21,22} Originally, ddPCR was developed to increase the sensitivity of PCR.²³ Several studies have found superiority of ddPCR over classic quantitative PCR, especially in terms of reproducibility and accuracy.^{24,25} The ddPCR assay we developed reached a detection limit for *CALR* mutations of at least 0.025%. Most patients having an initial allelic burden of approximately 50%; such sensitivity allows the monitoring of a reduction of allelic burden up to three orders of magnitude, which is equivalent to

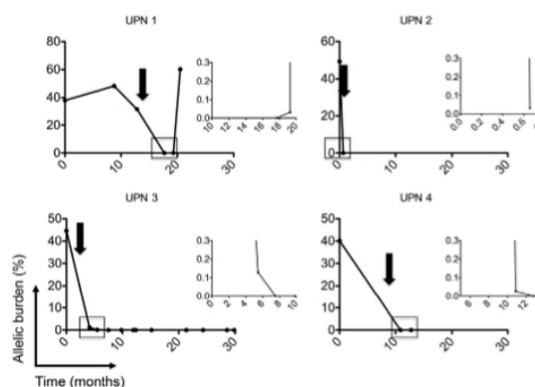


Figure 6 Use of droplet digital PCR (ddPCR) for monitoring residual disease in hematopoietic stem cell transplant (HSCT) patients. Droplet digital PCR was used to determine allelic burdens in four patients before and after HSCT for myelofibrosis. The vertical arrow indicates the HSCT. The insets represent an enlargement of the boxed area.

the level of the major molecular response, a therapeutic goal in chronic myelogenous leukemia. Repeatability and reproducibility were also better for ddPCR, with coefficients of variation three to 10 times lower than those of fragment analysis. Moreover, ddPCR presented a better linearity and accuracy than fragment length analysis. This phenomenon has also been observed by other researchers,²² with no clear explanation. In contrast, ddPCR had a very accurate allelic burden determination, superimposable to theoretical values. Other techniques have been described to quantify *CALR* mutations, including allele-specific quantitative PCR or massive parallel sequencing.^{16,22} The lowest detection limits achieved by these techniques are approximately 1%, which is sufficient for diagnosis purposes but not suited for MRD monitoring.

The importance of accurately assessing low levels of mutants in MPN has been well established for *JAK2 V617F*. After HSCT, persistence of residual disease >1% negatively affects evolution.²⁶ To determine whether identical results could be observed for *CALR* mutations, we assessed *CALR* allelic burdens in patients before and after allogeneic SCT for myelofibrosis. As was observed with *JAK2 V617F*, we noticed a marked decrease followed by a negativation of *CALR* mutational load in most patients.²¹ In one of them, the reappearance of detectable levels of *CALR* mutation has been detected preceding a relapse. This molecular relapse, which was at low level (0.03%), would have been missed by any other currently available technique. Because this study was retrospective, no therapeutic intervention has been undertaken, but in a prospective setting, one may think of modulating the immune response either by alleviating the immunosuppression or even by injecting donor lymphocytes, as has proven successful in MPN carrying *JAK2 V617F* mutations.¹³

In conclusion, for routine diagnostic purposes, alternative techniques, such as fragment length analysis or even Sanger sequencing, are better suited than ddPCR because they can detect any kind of mutations and low allele burdens are rare at diagnosis. However, ddPCR constitutes, for a relatively modest cost, a sensitive and accurate technique useful for both more accurately characterizing *CALR*-mutated MPN patients at diagnosis and better monitoring *CALR* allelic burden in treated patients, with the effect of possibly fine-tuning the therapeutic interventions.

Acknowledgments

We thank Cancéropôle Grand-Sud Ouest and La Ligue Contre le Cancer, Aquitaine-Charentes, for funding this research, the association Parentraides for helping with laboratory equipment, and CRB-Cancer CHU de Bordeaux for providing patient samples.

References

- James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W: A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005, 434:1144–1148
- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Boiret-Dupré N, Skoda RC, Hermouet S: The *JAK2-V617F* mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006, 108:1865–1867
- Tefferi A, Lasho TL, Huang J, Finke C, Mesa RA, Li CY, Wu W, Hanson CA, Pardanani A: Low *JAK2V617F* allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* 2008, 22:756–761
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR: *JAK2* exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007, 356:459–468
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL: *MPLW515L* is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006, 3:e270
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NCC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimir GI, Bagienski K, Milanese C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schönegger A, Bock C, Malcovati L, Pasutto C, Superti-Furga G, Cazzola M, Kralovics R: Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013, 369:2379–2390
- 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
- Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR: Progenitors homozygous for the *V617F* mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006, 108:2435–2437
- Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, Marfisi RM, Finazzi G, Guerini V, Fabris F, Randi ML, De Stefano V, Caberlon S, Tafuri A, Ruggeri M, Specchia G, Liso V, Rossi E, Pogliani E, Gugliotta L, Bosi A, Barbui T: Clinical profile of homozygous *JAK2 617V>F* mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 2007, 110:840–846
- Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, Rambaldi A, Lo Coco F, Antonioli E, Pieri L, Pancrazzi A, Ponziani V, Delaini F, Longo G, Ammatuna E, Liso V, Bosi A, Barbui T, Vannucchi AM: Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of *JAK2V617F* mutated allele. *Blood* 2009, 114:1477–1483
- Kiladjian J-J, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, Grandchamp B, Chomienne C, Fenaux P: Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood* 2008, 112:3065–3072
- Kröger N, Badbaran A, Holler E, Hahn J, Kobbe G, Bornhäuser M, Reiter A, Zabelina T, Zander AR, Fehse B: Monitoring of the *JAK2-V617F* mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood* 2007, 109:1316–1321
- Kröger N, Alchalby H, Klyuchnikov E, Badbaran A, Hildebrandt Y, Ayuk F, Bacher U, Bock O, Kvasnicka M, Fehse B, Zander A: *JAK2-V617F*-triggered preemptive and salvage adoptive immunotherapy with donor-lymphocyte infusion in patients with myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2009, 113:1866–1868
- Lippert E, Girodon F, Hammond E, Jelinek J, Reading NS, Fehse B, Hanlon K, Hermans M, Richard C, Swierczek S, Ugo V, Carillo S, Harrivel V, Marzac C, Pietra D, Sobas M, Mounier M, Migeon M, Ellard S, Kröger N, Herrmann R, Prchal JT, Skoda RC, Hermouet S: Concordance of assays designed for the quantification of *JAK2V617F*: a multicenter study. *Haematologica* 2009, 94:38–45

15. Jovanovic JV, Ivey A, Vannucchi AM, Lippert E, Oppliger Leibundgut E, Cassinat B, et al: Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPN-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia* 2013, 27: 2032–2039
16. Chi J, Manoloukos M, Pierides C, Nicolaidou V, Nicolaou K, Kleopa M, Vassiliou G, Costeas P: Calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms and new methodology for their detection and monitoring. *Ann Hematol* 2015, 94:399–408
17. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR: Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem* 2012, 84:1003–1011
18. 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, Ribrag V, Solary E, Plo I, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W, Marzac C, Bluteau O: Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* 2015, 29:249–252
19. Andrikovics H, Krahlting T, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M, Batai A, Dolgos J, Csomor J, Egyed M, Sipos A, Remenyi P, Tordai A, Masszi T: Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica* 2014, 99: 1184–1190
20. Cassinat B, Verger E, Kiladjian J-J: Interferon alfa therapy in CALR-mutated essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2014, 371: 188–189
21. Haslam K, Langabeer SE, Molloy K, McMullin MF, Conneally E: Assessment of CALR mutations in myelofibrosis patients, post-allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2014, 166:800–802
22. Jones AV, Ward D, Lyon M, Leung W, Callaway A, Chase A, Dent CL, White HE, Drexler HG, Nangalia J, Mattocks C, Cross NCP: Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res* 2015, 39:82–87
23. Vogelstein B, Kinzler KW: Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:9236–9241
24. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M: Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods* 2013, 10:1003–1005
25. Jennings LJ, George D, Czech J, Yu M, Joseph L: Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts by droplet digital PCR. *J Mol Diagn* 2014, 16:174–179
26. Lange T, Edelmann A, Siebolts U, Krahl R, Nehring C, Jäkel N, Cross M, Maier J, Niederwieser D, Wickenhauser C: JAK2 p.V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms one month after allogeneic stem cell transplantation significantly predicts outcome and risk of relapse. *Haematologica* 2013, 98:722–728

2. Résultats complémentaires

Comme nous allons le développer dans la 2^{ème} partie, la suite de notre travail a consisté à déterminer les mécanismes conduisant à la faible expression des protéines CALR mutantes comparativement à la protéine sauvage. La première raison à écarter était un défaut transcriptionnel ou une dégradation des ARNm de la forme mutante. Nous avons ainsi établi des comparaisons de charges mutationnelles sur des prélèvements de patients à partir d'ADN et d'ARN. Ces acides nucléiques ont été extraits de polynucléaires neutrophiles purifiés ou de leucocytes totaux. Dans ce dernier cas, une correction par la proportion de polynucléaires permet d'estimer le résultat qui aurait été obtenu sur une population purifiée. (Hermouet et al., 2007) La Figure 19 illustre que les résultats obtenus sur ARN après correction sont assez comparables à ceux observés sur ADN extrait de polynucléaires neutrophiles. Une comparaison sur des acides nucléiques extraits des mêmes populations cellulaires confirme par ailleurs ces données (Figure 20).

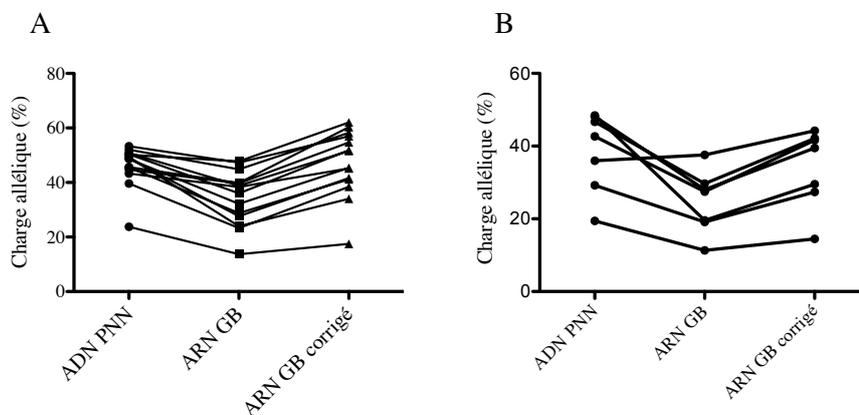


Figure 19 : Comparaison des charges alléliques *CALR* déterminées à partir d'ADN et d'ARN

Les charges alléliques des mutants *CALR* déterminées par analyse de fragments (A) ou PCR digitale (B) ont été comparées entre ADN de polynucléaires neutrophiles (ADN PNN), ARN de leucocytes totaux (ARN GB) et ARN de leucocytes totaux après correction par la polynucléose neutrophile (ARN GB corrigé) sur des prélèvements effectués à la même date.

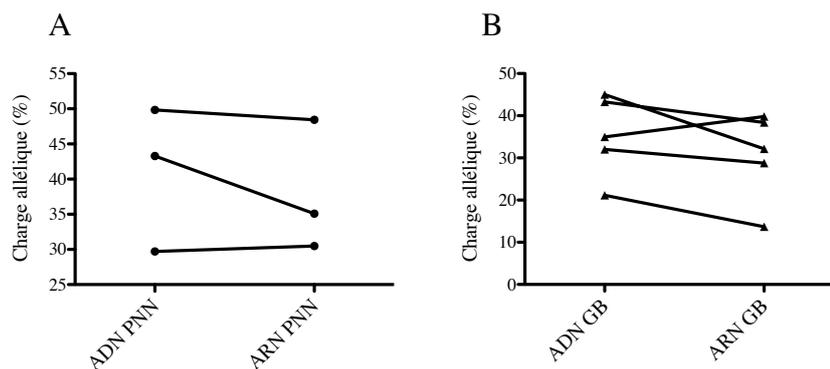


Figure 20 : Comparaison des charges alléliques des mutants *CALR* déterminées à partir d'ADN et d'ARN

Les charges alléliques *CALR* déterminées par analyse de fragments ont été comparées entre ADN et ARN extraits des mêmes populations cellulaires : polynucléaires neutrophiles (A) ou leucocytes totaux (B). Dans les 2 cas, les 2 types d'acides nucléiques ont été extraits à partir du même prélèvement.

La technique de PCR digitale nous a également été utile pour déterminer les niveaux d'expression des ARNm des variants de *CALR* dans nos lignées cellulaires. En effet, l'ajout de l'étiquette à la partie C-terminale de la protéine (un épitope Myc-6-Histidine) nous a conduit à supprimer la partie 3' non traduite. Or c'est à ce niveau que l'amorce anti-sens utilisée en analyse de fragments s'hybride. De ce fait, seule la technique de PCR digitale était utilisable pour déterminer les niveaux d'expression des ARNm de nos transgènes, qui se sont révélés être au moins égaux à ceux de la forme sauvage endogène.

Ces différentes données nous ont permis de conclure que les faibles niveaux d'expression des protéines *CALR* mutantes n'étaient pas liés à un défaut transcriptionnel ou une hyper-dégradation de leurs ARNm.

II. Article 2

Myeloproliferative neoplasm-associated calreticulin variants are substrates of an EDEM3-dependent ER-associated degradation pathway

Olivier Mansier, Valérie Prouzet-Mauleon, Kim Baroso, Gwénaële Jégou, A Chauveau, PY Dumas, Elodie Richard, Valérie Lagarde, Béatrice Turcq, Jean-Max Pasquet, Jean-François Viillard, Chloé James, Vincent Praloran, François-Xavier Mahon, Eric Chevet, Eric Lippert

Manuscrit en préparation

1. Synthèse de l'article

La calréticuline étant un acteur central dans le contrôle qualité des glycoprotéines sécrétées, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à étudier l'impact des mutations de *CALR* sur l'homéostasie du RE. Nos résultats indiquent que l'expression de ces protéines aberrantes perturbe peu ou pas l'équilibre de ce compartiment cellulaire. Ceci concorde avec des résultats d'étude de stress du RE effectuée chez des patients atteints de SMP : les patients présentant des mutations de *CALR* exhibent des niveaux d'épissage de XBP1 comparable à celui de patients non atteints de SMP.

Au début de notre travail, nous avons observé dans des lignées HEK293T transfectées et des lignées hématopoïétiques transduites que les niveaux d'expression des protéines mutantes étaient bien inférieurs à celui de la protéine sauvage. L'évaluation des charges alléliques *CALR* sur ARN nous a permis d'écarter des problèmes de transcription de nos transgènes. Cette faible expression des protéines mutées a par ailleurs été confirmée au niveau de plaquettes et de polynucléaires de patients exprimant la protéine mutée de façon endogène. Nous avons donc voulu déterminer les raisons de cette faible accumulation dans les cellules. Les mutations de *CALR* étant associées à la perte du motif de rétention dans le RE, la première hypothèse était celle d'une hypersécrétion des protéines mutantes. Cependant, que ce soit sur HEK293T ou sur les lignées hématopoïétiques (K562, DAMI, TF-1 et UT-7), aucun excès de relargage dans le milieu extracellulaire n'a pu être détecté.

La deuxième hypothèse expliquant la faible expression des protéines mutantes était celle d'une dégradation. Le traitement des cellules par des inhibiteurs du protéasome (MG132 et lactacystine) a permis d'observer de manière très reproductible une forte augmentation de l'expression des *CALR* mutées, pointant une dégradation dans laquelle la voie ERAD-protéasome joue un rôle prépondérant. L'inhibition de la voie autophagique ayant un effet plus faible, cette voie semble plus accessoire dans le phénomène de dégradation.

L'utilisation d'inhibiteurs de glucosidase et de mannosidase nous a indiqué que cette dégradation n'était pas médiée par des anomalies de motifs N-glycosylés. Par contre, un criblage moléculaire avec des siARN nous a permis d'identifier EDEM3 comme un acteur

majeur dans cette dégradation, son extinction permettant d'augmenter l'expression des protéines mutantes de type 1 et de type 2.

Pour finir, nous avons voulu déterminer si EDEM3 pouvait constituer une cible thérapeutique intéressante pour atteindre spécifiquement les clones présentant une mutation de *CALR*. Une première approche a consisté à sur-exprimer EDEM3 afin de « nettoyer » les cellules des protéines mutées persistantes dans les cellules. Cette approche n'a cependant pas permis d'inhiber la prolifération associée aux protéines mutantes. Une deuxième approche a consisté au contraire à rechercher les effets d'une extinction d'EDEM3 sur la survie et la prolifération cellulaire. Selon cette seconde hypothèse, la dégradation des protéines mutantes est nécessaire afin qu'elles n'exercent pas d'effet toxique. Les résultats de cette partie ne sont cependant pas encore disponibles.

Myeloproliferative neoplasm-associated calreticulin variants are substrates of an EDEM3-dependent ER-associated degradation pathway

Olivier Mansier^{1,2,3}, Valérie Prouzet-Mauleon^{1,3}, Kim Baroso^{4,5}, Gwénaële Jégou^{4,5}, A Chauveau^{6,7,8}, PY Dumas^{1,9}, Elodie Richard^{1,3}, Valérie Lagarde^{1,3}, Béatrice Turcq^{1,3}, Jean-Max Pasquet^{1,9}, Jean-François Viillard¹⁰, Chloé James^{1,2,11}, Vincent Praloran^{2,6}, François-Xavier Mahon^{1,3,12}, Eric Chevet^{3,4*}, Eric Lippert^{6,7,8*}

¹Université de Bordeaux, UFR Sciences de la Vie et de la Santé, Bordeaux, France

²CHU Bordeaux, Laboratoire d'Hématologie, Bordeaux, France

³INSERM U1218, ACTION, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

⁴INSERM U1242, Université de Rennes 1, Rennes, France.

⁵Centre de Lutte Contre le Cancer, Eugène Marquis, Rennes, France.

⁶CHRU Brest, Laboratoire d'Hématologie, Brest, France

⁷INSERM U1078, CHRU Brest, Brest, France

⁸Université de Bretagne Occidentale, UFR Médecine, Brest, France

⁹INSERM U1035, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

¹⁰CHU de Bordeaux, Service de Médecine Interne, Bordeaux, France.

¹¹INSERM U1034, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

¹²Institut Bergonié, Bordeaux, France

Abstract

Mutations in the Calreticulin gene (*CALR*) observed in Myeloproliferative Neoplasms (MPN) were recently shown to be pathogenic via their interaction with MPL and the subsequent activation of the JAK-STAT pathway. However, little is known on the biological properties of those variant *CALR* proteins and their impact on endoplasmic reticulum (ER) homeostasis. In this study, we showed that expression of *CALR* mutants does not compromise ER homeostasis in cultured cells or in patients' samples nor the sensitivity of hematopoietic cells towards ER stress-induced cell death. Interestingly, we showed that the expression of *CALR* variants is generally low because of their degradation mostly through an ER Associated Degradation (ERAD)-proteasome pathway. Furthermore we identified EDEM3 as the major ERAD component involved in the degradation of *CALR* variants. We propose that EDEM3 and more generally the ERAD could be considered as potential therapeutic targets for selectively inhibiting the *CALR* mutant-dependent proliferation associated with MPN.

Introduction

Essential Thrombocythemia (ET) and Primary Myelofibrosis (PMF) are classical Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms (MPN) characterized by a proliferation predominantly affecting the megakaryocytic compartment.(1) The pathophysiology of these hematological malignancies became clearer after the discovery of mutations in *JAK2* (2,3,4,5) and in the thrombopoietin receptor *MPL*(6) that were responsible for the constitutive activation of the JAK-STAT pathway. More recently mutations in the *calreticulin* gene (*CALR*) bridged some gaps in the mechanisms underlying the oncogenesis of JAK- and MPL-unmutated ET and PMF.(7,8) Calreticulin is an endoplasmic reticulum (ER) resident lectin mainly involved in the quality control and productive folding of secretory glycoproteins.(9) Calreticulin, together with its transmembrane homolog calnexin(10), binds monoglucosylated newly synthesized glycoproteins and contribute to their productive folding before export to their final destination site.(11) When newly synthesized glycoproteins cannot achieve proper folding due to the presence of mutations or environmental challenges, they enter a glycoprotein quality control machinery comprising UDP-glucose glucosyl transferases (UGGT) and ER mannosidases that will allow for more folding cycles.(12) If they still fail to achieve the expected conformation, improperly folded glycoproteins are triggered for degradation through the ER Associated Degradation (ERAD)-proteasome system.(13) In some circumstances, for instance when ERAD is saturated, misfolded proteins can accumulate in the ER thereby leading to a condition known as ER stress.(14) ER stress triggers an adaptive signaling pathway named the Unfolded Protein Response (UPR) that aims at restoring ER homeostasis.(15)

The *CALR* mutations discovered in ET and PMF consist of +1/-2 frameshift mutations in the exon 9 leading to the generation of a novel, positively charged C-terminal sequence and a loss of the KDEL ER-retention motif.(7,8) Despite recent advances highlighting the interaction between mutant *CALR* and the *MPL* receptor which trigger the constitutive activation of the JAK-STAT pathway,(16,17) the precise mechanisms involved in the oncogenic properties of *CALR* variants remain poorly understood. In the present study, we show that expression of *CALR* variants in cultured cells does not significantly disturb ER homeostasis. Moreover, *CALR* variants were found to be faintly expressed in the cells, not because of an excessive secretion associated with the loss of the KDEL motif, but rather due to a catabolic process mainly mediated by the ERAD-proteasome system. We identified EDEM3 as one key actor involved in this mechanism, required to trigger the degradation of

CALR variants. We propose that EDEM3 and the ERAD-proteasome pathway could represent therapeutic targets for selectively targeting CALR mutant-clones in MPN.

Material and methods

Patients and DNA constructs

Complementary DNA from patients with *CALR* WT, type 1 (del52, c.1099_1150del) or type 2 (ins5, c.1154_1155insTTGTC) mutants were obtained at CRB santé – CHU de Bordeaux after written informed consent. They were cloned into pcDNA6-Myc-6xHis, with the KDEL motif cloned prior to the Myc-6xHis-epitope for the WT *CALR*. These constructs of tagged *CALR* were then subcloned into the pCW57.1 (tetracycline-inducible expression; kind gift of R. Iggo, Univ. Bordeaux) using the Gateway technology (Thermo Fisher). Non tagged WT, del52 and ins5 *CALR* were obtained by directly cloning their cDNA into a lentiviral vector bearing a GFP reporter gene. The MPL cDNA was obtained from a healthy donor and cloned into a lentiviral vector carrying a Tomato fluorescent reporter. EDEM3 cDNA was amplified from HEK293T cells and cloned into a lentiviral vector carrying a ZsGreen fluorescent reporter with insertion of a 3X-Flag tag before the KDEL motif. CRISPR-based extinction of EDEM3 expression was achieved by cloning the specific sgRNA (5'-actcgacctctacagggttaaagg) into a plasmid derived from lentiCRISPRv2, a gift from Feng Zhang, Adgene plasmid #52961(18), in which the puromycin resistance gene was replaced by a ZsGreen fluorescent reporter gene. Total leukocytes from MPN patients and patients with reactive hyperleukocytosis were purified from peripheral blood samples by lysis of red blood cells.

Cell culture and lentiviral transduction

HEK293T cells were cultured in DMEM (Life technology) supplemented with 10% FBS, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL and L-glutamine 2 mM and were transfected using the calcium phosphate method. K562 and TF-1 were obtained from DSMZ and cultured in RPMI (Life technologies) supplemented with 10% FBS, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL and L-glutamine 2 mM. UT-7 MPL were generated by transduction of UT-7 EPO cells with a MPL lentiviral vector and cultured in IMDM (GE Healthcare, Fisher Scientific) supplemented with 10% FBS, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL, L-glutamine 2 mM, HEPES 10mM and β-mercaptoethanol 50 µM. TF-1 and UT-7 MPL were cultured in presence of 10 ng/mL of rhIL3 or rhTPO respectively. DAMI cells

were cultured in IMDM supplemented with 10% FBS, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL and L-glutamine 2 mM. Lentiviral vectors were produced by the vectorology platform of the University of Bordeaux. After transduction, cells were selected by puromycin treatment or sorted on the expression of the fluorescent reporter. For the pCW57.1 vector, expression of the transgenes was induced by treatment with doxycycline 2 µg/mL (Sigma Aldrich).

Chemicals and antibodies

Proteasome inhibitor MG-132 (10 µM) and DBeQ (5 µM) were obtained from Santa Cruz Biotechnologies. Autophagy inhibitors chloroquine (CQ, 50-100 µM) and Bafilomycin A1 (Bafilo, 100 µM), Tauroursodesoxycholic acid (TUDCA, 1 mM) and 4-phenylbutyric acid (4-PBA; 5 mM), the glucosidase inhibitor castanospermin (CST, 750 µM) and the mannosidase inhibitor kifunensin (KIF, 25 µg/mL) were from Sigma Aldrich. The proteasome inhibitor lactacystin (LCT, 50 µM), the glucosidase inhibitor 1-Deoxynojirimycin (DNJ, 1 mM) and the N-glycosylation inhibitor tunicamycin (Tc) were obtained from Calbiochem. Proteases inhibitor cOmplete™ was from Roche. Monoclonal rabbit anti-calreticulin (EPR3924) and rabbit polyclonal anti-MPL (06-944) were from Merck Millipore. The mouse monoclonal antibody CAL2 (Dianova) against the C-terminal sequence of the CALR mutants was purchased from Dianova. The mouse monoclonal anti-Myc antibody (9E10) and rabbit anti-STAT5 were ordered from Santa Cruz Biotechnology. Monoclonal anti-actin antibody, monoclonal antibody against Flag tag (F1804) and EDEM3 (E0409, a kind gift of M. Bouchecareilh, Univ. Bordeaux) were from Sigma-Aldrich. Rabbit anti-Phospho-STAT5-antibody (Y694) was purchased from Cell Signaling Technology. Annexin V-APC was from eBiosciences and DAPI from ThermoFischer Scientific.

RNA Interference

siRNAs against different actors of ERAD were obtained from Ambion (ThermoFischer Scientific). These oligonucleotides were delivered into HEK293T cells by transfection at a concentration of 50 nM using the calcium phosphate method.

Proliferation and apoptosis assays

UT-7 MPL cells were washed four times in PBS before resuspension in IMDM in presence or absence of Doxycyclin and TPO. MTS assays were performed with the Celltiter-Glo reagent (Promega) according the manufacturer's instructions. Viable cell counts (Annexin V - / DAPI -) were performed on a FACSCantoII using HTS module. Cellular

mortality was expressed as the proportion of cells labelled by annexin V (labelled by DAPI or not). Data were analyzed with FACS Diva software.

Western blotting

Cells were lysed with Laemmli buffer or Cell Lysis Buffer (Cell Signalling Technology). After separation by SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membranes with Transblot Turbo (Bio Rad). Proteins were detected via chemoluminescence with a LAS-3000 Camera (Fujifilm) or Amersham Hyperfilm MP autoradiography films (GE Healthcare) and quantified using ImageJ software. Proteins contained in the supernatants were precipitated by trichloroacetic acid treatment, then washed twice with acetone and resuspended in Laemmli buffer before analysis by Western blot as previously described.

RT-qPCR and ddPCR

Total RNA were extracted using Trizol reagent (Life technologies) and treated by DNase (Ambion) before cDNA synthesis with First Strand cDNA synthesis kit (Roche) according to manufacturer's instructions. CALR mRNA expression was assessed by digital droplets PCR (ddPCR) as previously described.⁽¹⁹⁾ UPR target genes expression and XBP1 splicing were evaluated as previously described.⁽²⁰⁾

Statistical analyses

Statistical analysis was performed by one-way ANOVA, paired t-test (to evaluate the impact of treatments), or unpaired t-test (to compare the effects of the different forms of CALR). All analyses were performed using GraphPad Prism software. Significant differences were determined by $p < 0.05$.

Results

Mutant CALR expression does not alter ER homeostasis

CALR having a central role in the quality control of glycoproteins in the secretory pathway, we first asked if the expression of CALR mutants disturbed ER homeostasis. Moreover, CALR mutations being associated with a specific megakaryocytic proliferation, we addressed this question by using hematopoietic cell lines with megakaryocytic features. The expression of 3 UPR target genes (each being induced by one branch of this adaptive pathway) was assessed following WT or mutant CALR expression using a tetracyclin-inducible lentiviral vector. In DAMI cells, the induction of neither del52 nor ins5 CALR mutants jeopardize the ER homeostasis, but on the contrary led to a global decrease in the expression of UPR target genes (Fig. 1A-B) although this observation was significant only for XBP1 splicing (for ins5 mutant, $p=0.0055$) and CHOP (for both del52 and ins5 mutants, $p=0.0098$ and $p=0.0061$ respectively). Of note, this trend to reduce UPR target genes expression was also observed after over-expression of the WT CALR. Similar results were observed in UT-7 cells, without reaching statistical significance (data not shown). In accordance with these data, transfection of HEK293T with CALR mutants or induction of CALR mutants in UT-7 cells did not alter endogenous WT CALR expression, as would be expected in response to ER stress. Moreover, ER stress as determined by XBP1 splicing was not different between leukocytes of *CALR* mutated patients and those of patients with reactive hyperleukocytosis (Fig. S1). These results suggest an attenuation of ER stress by WT or mutant CALR overexpression which prompted us to determine whether this could lead to a decrease of ER stress induced-apoptosis. Treatment of UT-7 cells with tunicamycin or MG-132 increased cell mortality after 24h, but CALR mutant expression did not modify the proportion of apoptotic cells when compared to CALR WT overexpression condition. (Fig. 1C). These results suggest that expression of variant CALR does not significantly disturb ER homeostasis nor does it change cell sensitivity toward ER stress induced-apoptosis. Thus, ER stress does not seem to represent an important mechanism by which mutations of *CALR* affect the proliferation of MPN cells.

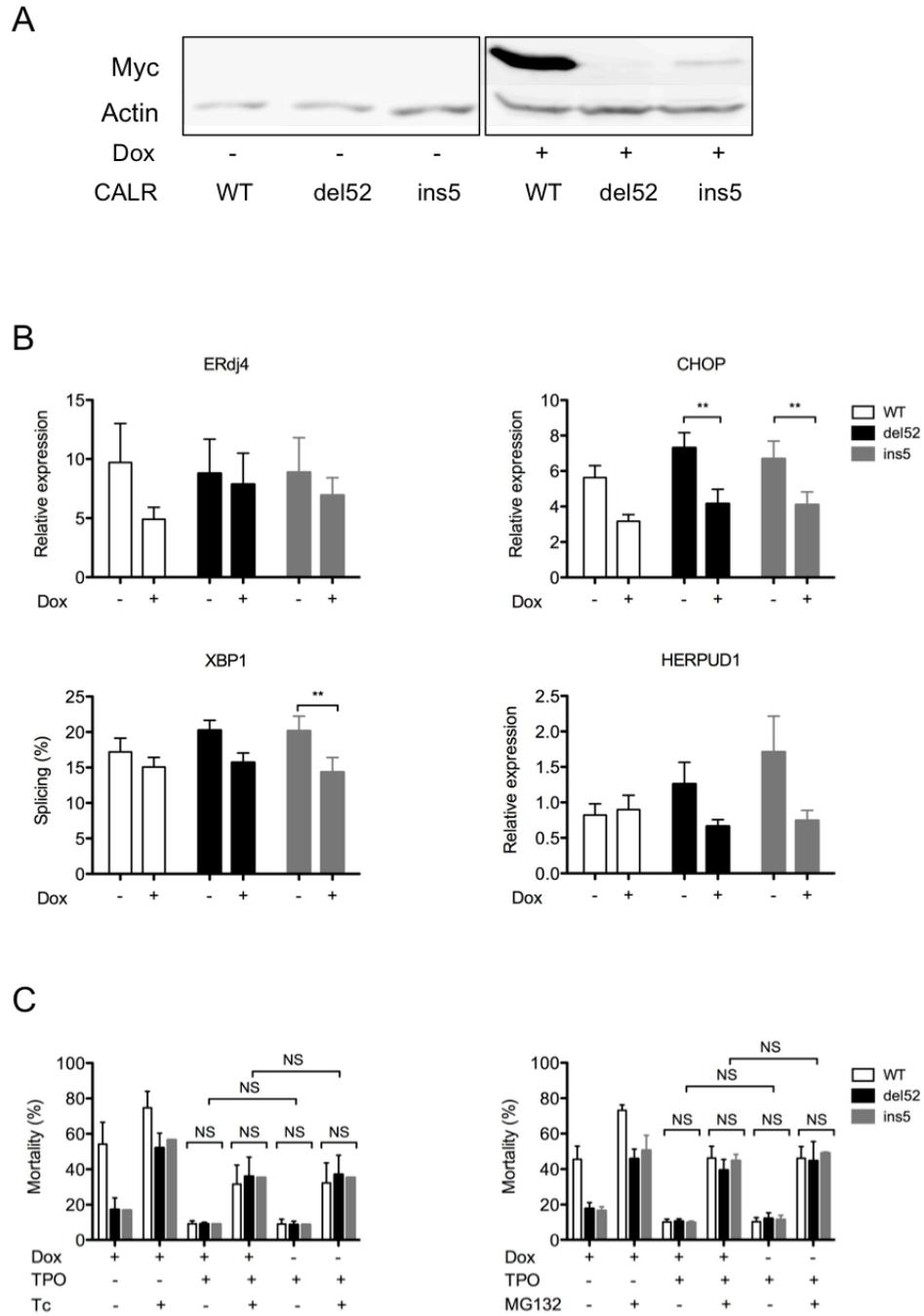
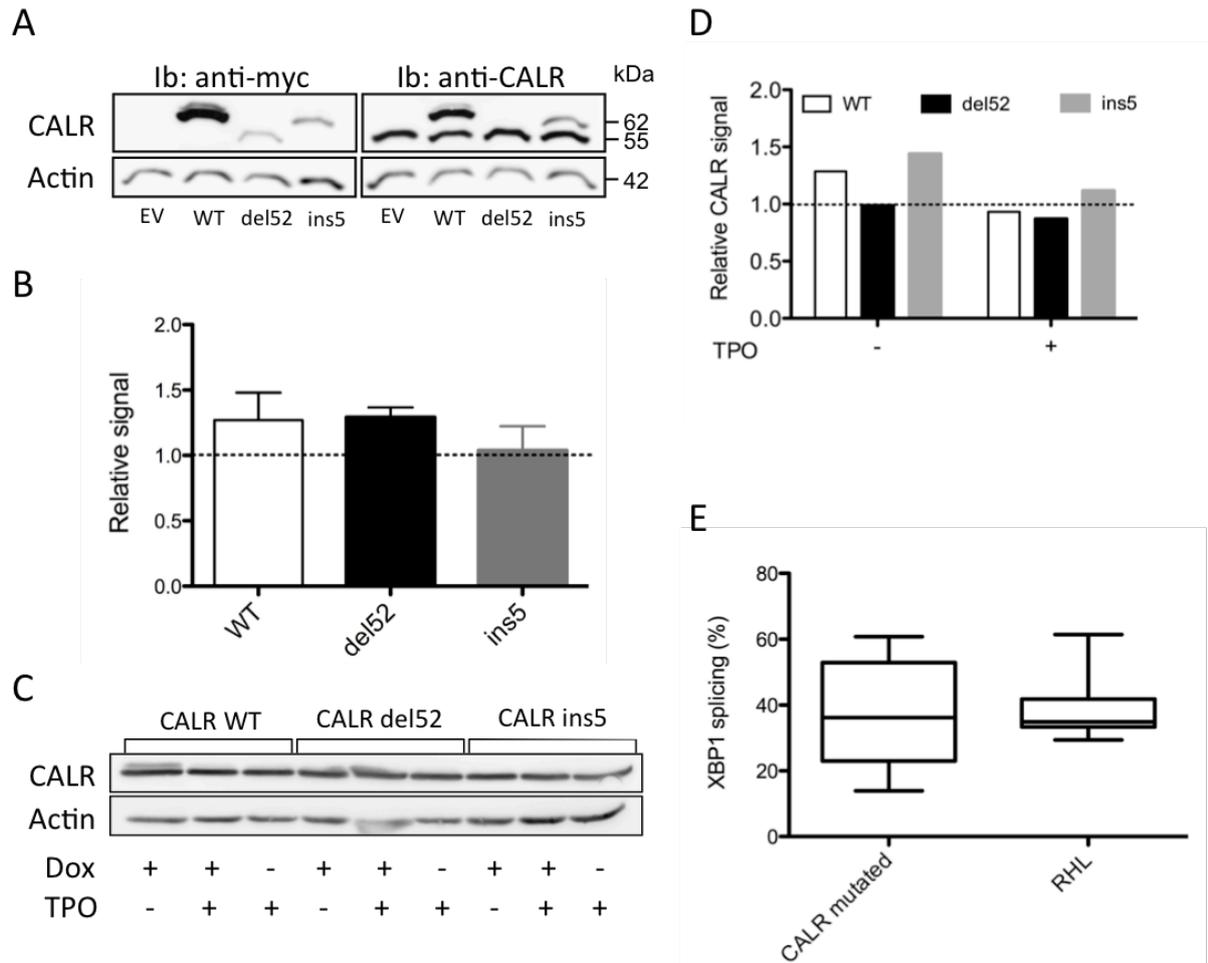


Figure 1: Impact of CALR mutant expression on ER homeostasis

Figure 1: Impact of CALR mutant expression on ER homeostasis

Hematopoietic cell lines DAMI and UT-7 were transduced with pCW57.1 vector enabling tetracyclin-inducible expression of Myc-6xHis tagged WT or mutant CALR. (A) Twenty-four hours after induction (or not) by Doxycyclin treatment (Dox), cell lysates were analyzed by western-blot analysis. Actin serves as a loading control. Shown are the results observed in the DAMI cell line. Identical profile has been obtained with the UT-7 cell line (B) Expression of WT, del52 and ins5 CALR mutants was induced in DAMI cell line with a tetracyclin-inducible vector. The expression of UPR target genes was assessed by RT-qPCR before and 48h after treatment by doxycyclin (+Dox). A control in absence of Doxycyclin 48h after start of the experiment was included (-Dox). GAPDH was used as control gene, and results normalized on the expression of the target gene by U87 cell line. For XBP1 splicing analysis, a RT-PCR was performed. Quantification was realised by densitometry analysis. Results are expressed as the ratio of the signal corresponding to the spliced form to signal relative to total XBP1 (spliced + non-spliced) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (C) Cell mortality was assessed by Annexin V-DAPI labeling 24h after transgene expression induction and treatment by Tunicamycin (Tc, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ left panel) or MG-132 (1 μM , right panel). DMSO was used as a vehicle control. Results are expressed as the mean proportion of cells positive for Annexin V in 3 (MG-132) or 4 (tunicamycin) independent experiments.



Supplemental Figure S1: Expression of CALR mutants does not compromise ER homeostasis.

Supplemental Figure S1: Expression of CALR mutants does not compromise ER homeostasis.

(A) HEK293T were transfected with pcDNA6 plasmids to express Myc-6xHis tagged WT or mutant CALR proteins. Forty-eight hours later, endogenous WT CALR expression was assessed by western-blotting using the anti-total CALR antibody. Actin was used as a loading control. (B) The expression of the endogenous WT CALR was quantified and expressed as the ratio of CALR signal to actin signal and normalized against the “empty vector” condition. For Myc-6xHis tagged del52 mutant CALR (which presents the same molecular weight as the endogenous CALR) a correction was applied by subtracting the signal generated by the transgene estimated from the comparison of the signal measured for WT and ins5 CALR with anti-Myc and anti-CALR antibodies. Results are presented as mean +/- SEM of 3 independent experiments. The dashed line represent to the basal level expression. (C) Expression of WT, del52 and ins5 CALR mutants was induced in UT-7 cell line with a tetracyclin-inducible vector. Forty-eight hours later, endogenous WT CALR expression was assessed by western-blotting using the anti-total CALR antibody. Actin was used as a loading control. (D) The expression of the endogenous WT CALR was quantified and expressed as the ratio of CALR signal to actin signal and normalized against the “non induced” condition (-Dox). The dashed line represent to the basal level expression. (E) Leucocytes were obtained from peripheral blood samples of *CALR* mutated MPN patients and from patients presenting with reactive hyperleucocytosis (RHL). After extraction of RNA, XBP1 splicing was determined by RT-PCR and densitometry analysis. The boxes represent the dispersion from minimum to maximum values. Ten patients were tested in each group.

Supplemental Table 1 : characteristics of patients analysed for ER stress in peripheral leukocytes

Patient	Diagnosis	CALR		XBP1 splicing
		Status	Mutation	
UPN1	ET	P	c.1099_1150del	60,8
UPN2	ET	P	c.1099_1150del	27,2
UPN3	ET	P	c.1154_1155insTTGAC	59,7
UPN4	ET	P	c.1099_1150del	26,0
UPN5	ET	P	c.1099_1150del	44,7
UPN6	PMF	P	c.1099_1150del	13,9
UPN7	ET	P	c.1099_1150del	45,2
UPN8	ET	P	c.1099_1150del	50,7
UPN9	ET	P	c.1154_1155insTTGTC	27,8
UPN10	PMF	P	c.1154_1155insTTGTC	14,2
UPN11	RHL	N	-	35,4
UPN12	RHL	N	-	61,4
UPN13	RHL	N	-	29,4
UPN14	RHL	N	-	42,3
UPN15	RHL	N	-	37,8
UPN16	RHL	N	-	34,4
UPN17	RHL	N	-	34,4
UPN18	RHL	N	-	32,1
UPN19	RHL	N	-	33,8

ET: Essential Thrombocythaemia, PMF: Primary Myelofibrosis, RHL: Reactive Hyperleukocytosis, N: Negative, P: Positive, ND: Not Determined,

Low expression of CALR mutant proteins is not due to excessive secretion

In order to study the specific expression of mutant CALR, we transfected HEK293T cells with pcDNA6 plasmids allowing the expression of a Myc-6xHis tagged proteins. Exogenous proteins were revealed using Western blot via their Myc epitope. While the WT protein was nicely expressed, the expression of the del52 and ins5 mutants was about 20-fold lower than the WT protein (Fig. 2A-B). This low expression level of CALR mutants was confirmed on platelets and polymorphonuclear cells purified from patients' samples (Fig. S2). As these proteins lose their KDEL ER-retention motif, we hypothesized that this low expression could be due to increased leakage in the extracellular medium. To address this, proteins present in the cell supernatant were precipitated with trichloroacetic acid and analyzed by Western blot. Significant amounts of WT CALR were detected in the supernatants, but only limited quantities of CALR mutant proteins were found in the medium thereby indicating that low levels detected in the cells were not due to excessive secretion (Fig. 2A). This difference was not explained by a poor transcription rate since mutant CALR mRNA were largely predominant when quantified using ddPCR (Fig. 2C). Similar results were observed in hematopoietic cell lines: in K562, DAMI, UT-7 MPL and TF-1 cells, mutant CALR protein levels were much lower than WT CALR: the del52 mutant was barely detectable and the ins5 mutant was expressed at a level ~45 fold lower than the WT (Fig. S3A-B). Similarly to HEK293T cells, no secretion of the mutant proteins was detected in the supernatant of these hematopoietic cell lines (Fig. S3A). The mean allelic burdens measured on cDNA for del52 and ins5 mutants were respectively of 62% and 61% in K562 cells, 60% and 55% in DAMI cells, 50% and 51% in UT-7 MPL cells and 20% and 33% in TF-1 cells (Fig. S3C).

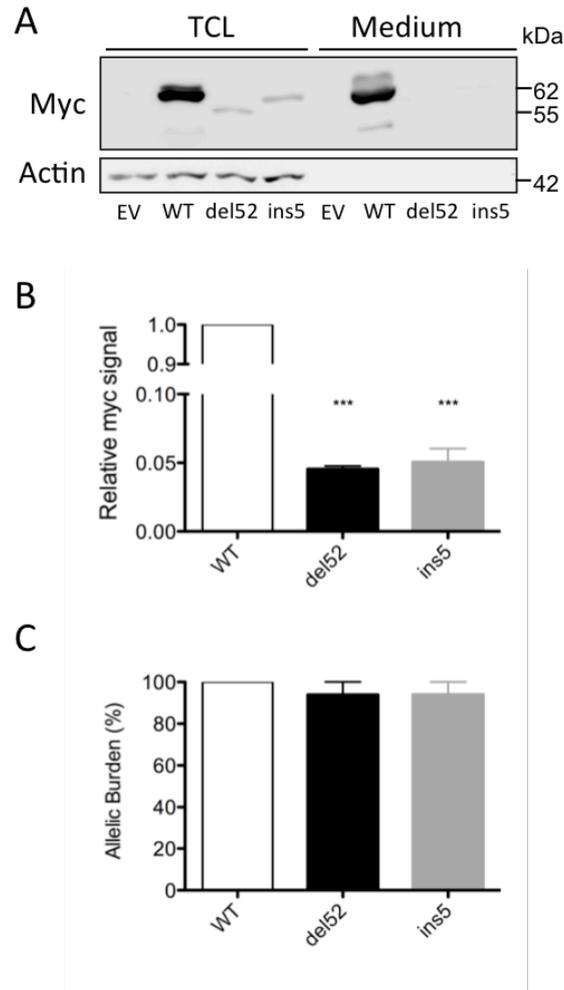
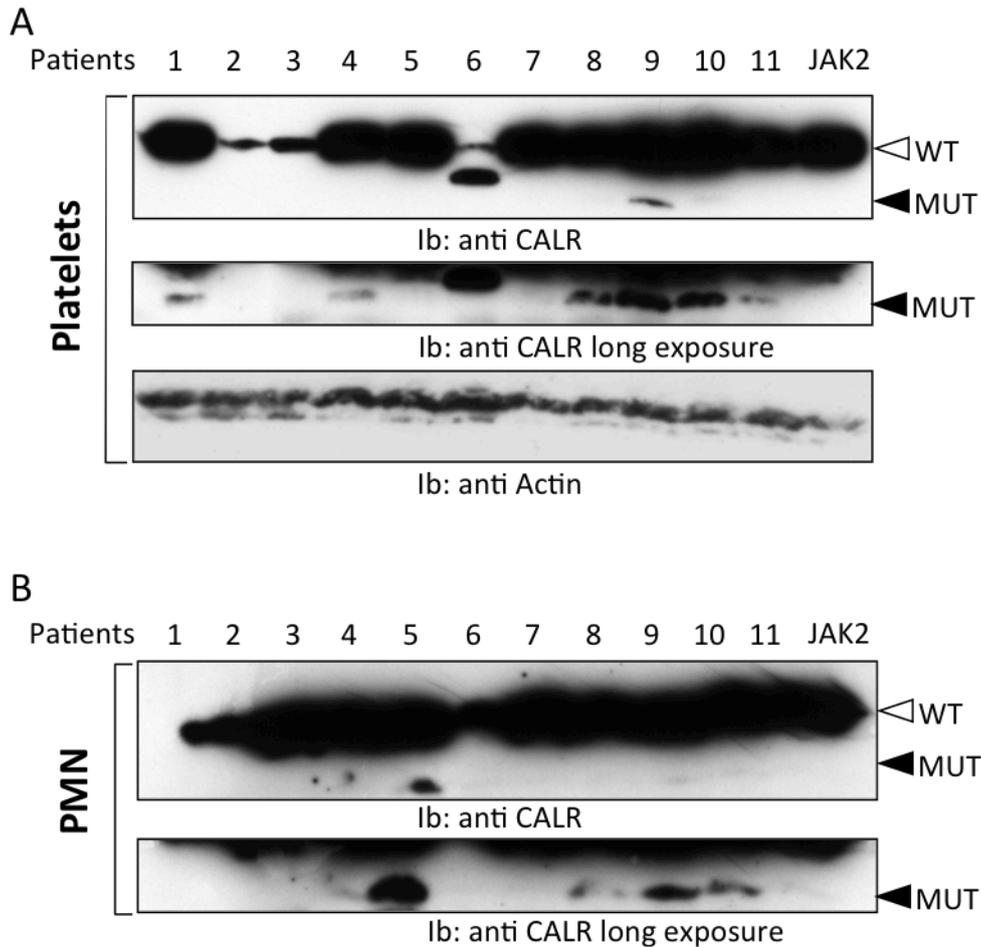


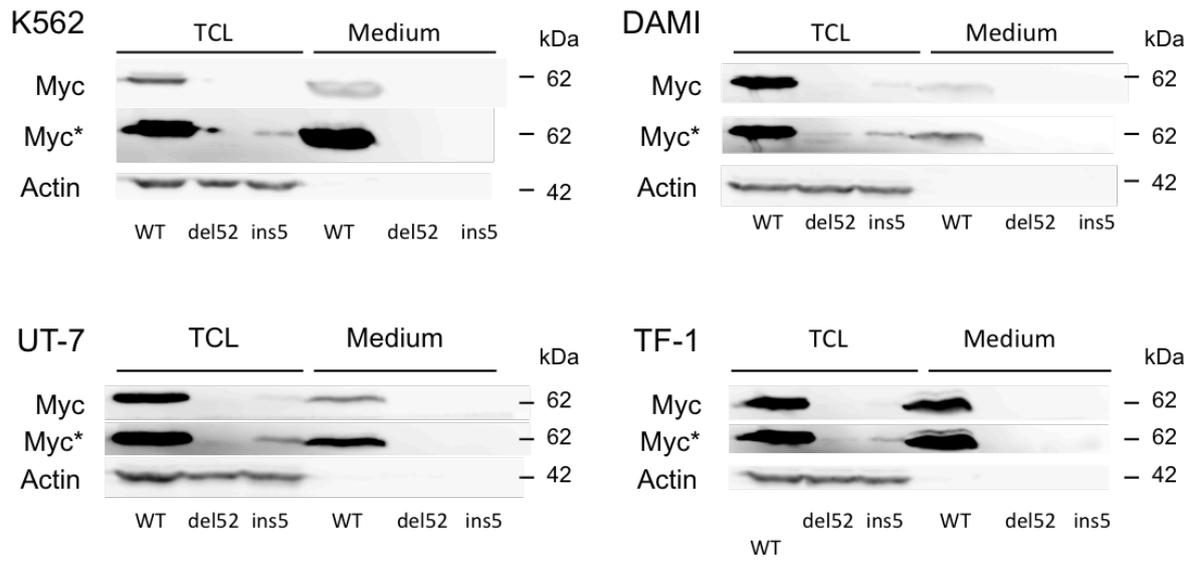
Figure 2: CALR mutant proteins are faintly expressed but not because of an excessive secretion. (A) HEK293T were transfected with pcDNA6 plasmids. Forty eight hours later, cells were lysed in laemmli buffer. Proteins of cell supernatants were precipitated and solubilized in laemmli buffer. Total cell lysates (TCL) and supernatants (Medium) extracts were subjected to western-blot analysis. Actin serves as a loading control for cell lysates. Transfected CALR were revealed through their Myc epitope (B) Quantification of the signals measured on western-blot analysis of the total cell lysates of transfected HEK293T cells performed in (A). Results are expressed as the ratio of Myc signal to actin signal, normalized on the CALR WT level. The histogram represents the mean \pm SEM of 3 independent experiments. *** $p < 0.001$ (C) Quantification of *CALR* allelic burdens on RNA of HEK293T 48h after transfection with pcDNA6 vectors. Results are expressed as the ratio of the copy number of mutant CALR to the copy number of total CALR. The histograms represent the mean \pm SEM of 3 independent experiments.



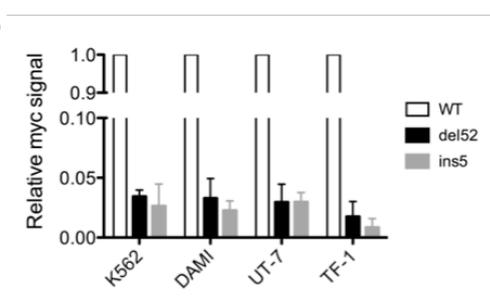
Supplemental Figure S2: CALR mutant are poorly expressed in primary cells.

Platelets and polymorphonuclear (PMN) cells were purified from peripheral blood of 11 *CALR* mutated (patients number 1 to 11) and 1 *JAK2V617F* mutated MPN patients (JAK2). All *CALR* mutations patients presented with a heterozygous del52 mutation except patient 6 who harbored a homozygous ins5 mutation. *CALR* proteins expression was assessed by western-blotting using anti-total *CALR* antibody. Actin was used as loading control. The white arrow indicate the WT *CALR* while the black one the position of the type-1 mutant *CALR*.

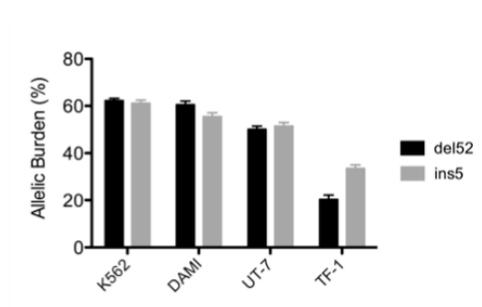
A



B



C



Supplemental Figure S3: Low expression of CALR mutant proteins in hematopoietic cells is not due to an excessive secretion.

Supplemental Figure S3: Low expression of CALR mutant proteins in hematopoietic cells is not due to an excessive secretion.

Hematopoietic cell lines were transduced with pCW57.1 vector enabling tetracyclin-inducible expression of Myc-6xHis tagged WT or mutant CALR. (A) Twenty-four hours after induction, cell lysates and supernatants were analyzed by western-blot analysis. Actin serves as a loading control for cell lysates. Exogenous CALR were revealed through their Myc epitope as in Fig 2. Myc* denotes longer exposure for Myc epitope revelation. These experiments have been performed twice for each cell line. (B) Quantification of signals measured on western-blot analysis of total cell lysates performed in (A). Results are expressed as the ratio of Myc signal to actin signal, normalized on the CALR WT level. The histogram represents the mean +/- SEM of 2 independent experiments. (C) Quantification of CALR allelic burdens on RNA of indicated hematopoietic cell lines 24h after induction of transgene expression by doxycycline treatment. Results are expressed as the ratio of the copy number of CALR mutant to total copy number of CALR. The histogram represents the mean +/- SEM of 3 independent experiments.

ERAD affects mutant CALR expression

Since there was no difference in transcription levels and no excessive secretion of mutant CALR proteins, we hypothesized that their low expression levels might be due to excessive degradation. Concordant with this hypothesis, treatment of transfected HEK293T cells by the proteasome inhibitor MG-132 led to an increase in mutant CALR expression by a mean factor of 5 (Fig. 3A). Similar results were observed in hematopoietic cells, MG-132 raising del52 and ins5 mutant CALR proteins expression by mean factors of 15 ($p=0.0091$) and 12 ($p=0.0019$) respectively in UT-7 MPL and 7 ($p=0.0055$) and 11 ($p=0.0051$) in DAMI (Fig. 3C and Fig. S4). By contrast, this drug only increased the level of WT CALR by a mean factor of 4.5. Of note, lactacystin, another proteasome inhibitor increased mutant protein levels with an efficacy similar to that of MG-132 (Fig. 4A-B). Autophagy being a second possible mechanism involved in mutant CALR proteins degradation, we inhibited this pathway by treating transfected or transduced cells with chloroquine and bafilomycin A1. In HEK293T, chloroquine and bafilomycin A1 treatments lead to an increased expression of del52 mutant by a mean factor of 4.2 ($p=0.0022$) and 1.6 ($p=0.0007$) respectively while they did not significantly increased WT CALR protein levels (Fig 3B). In hematopoietic cells, the effects of autophagy inhibitors were less pronounced. Indeed chloroquine and bafilomycin A1 only increased the expression levels of CALR ins5 mutant by a mean factor of 2.8 ($p=0.0432$) and 2.7 ($p=0.0177$) in DAMI cells, respectively. No significant effect was observed for ins5 mutant in UT-7 MPL cells, nor for del52 mutant in DAMI and UT-7 MPL cells.

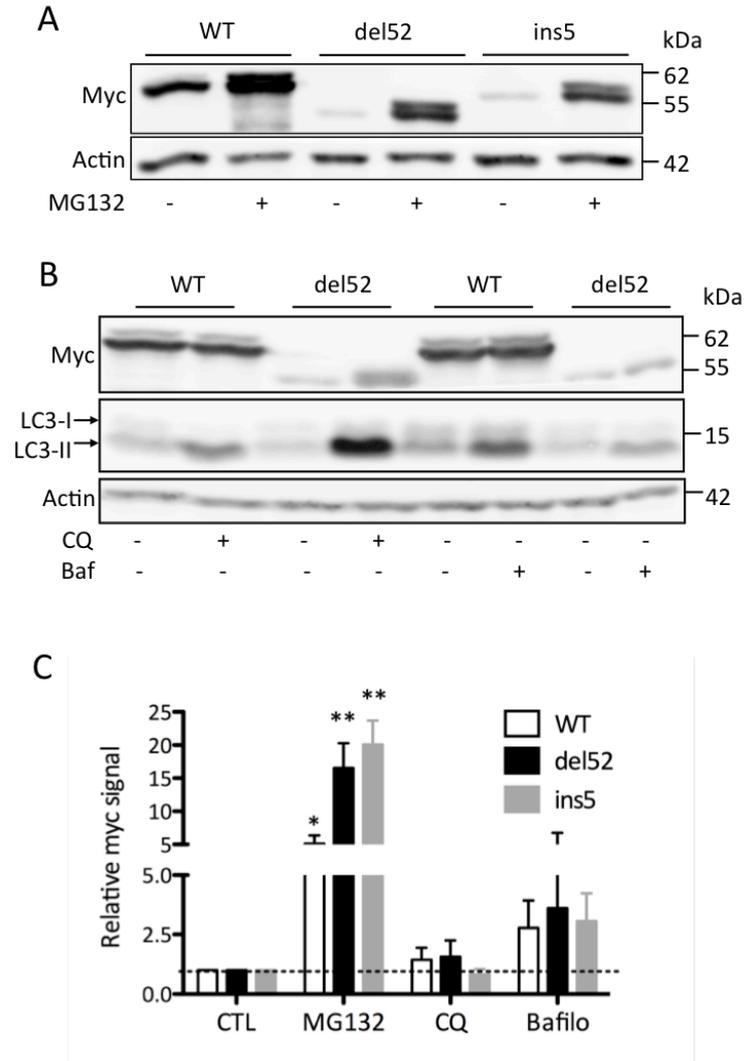
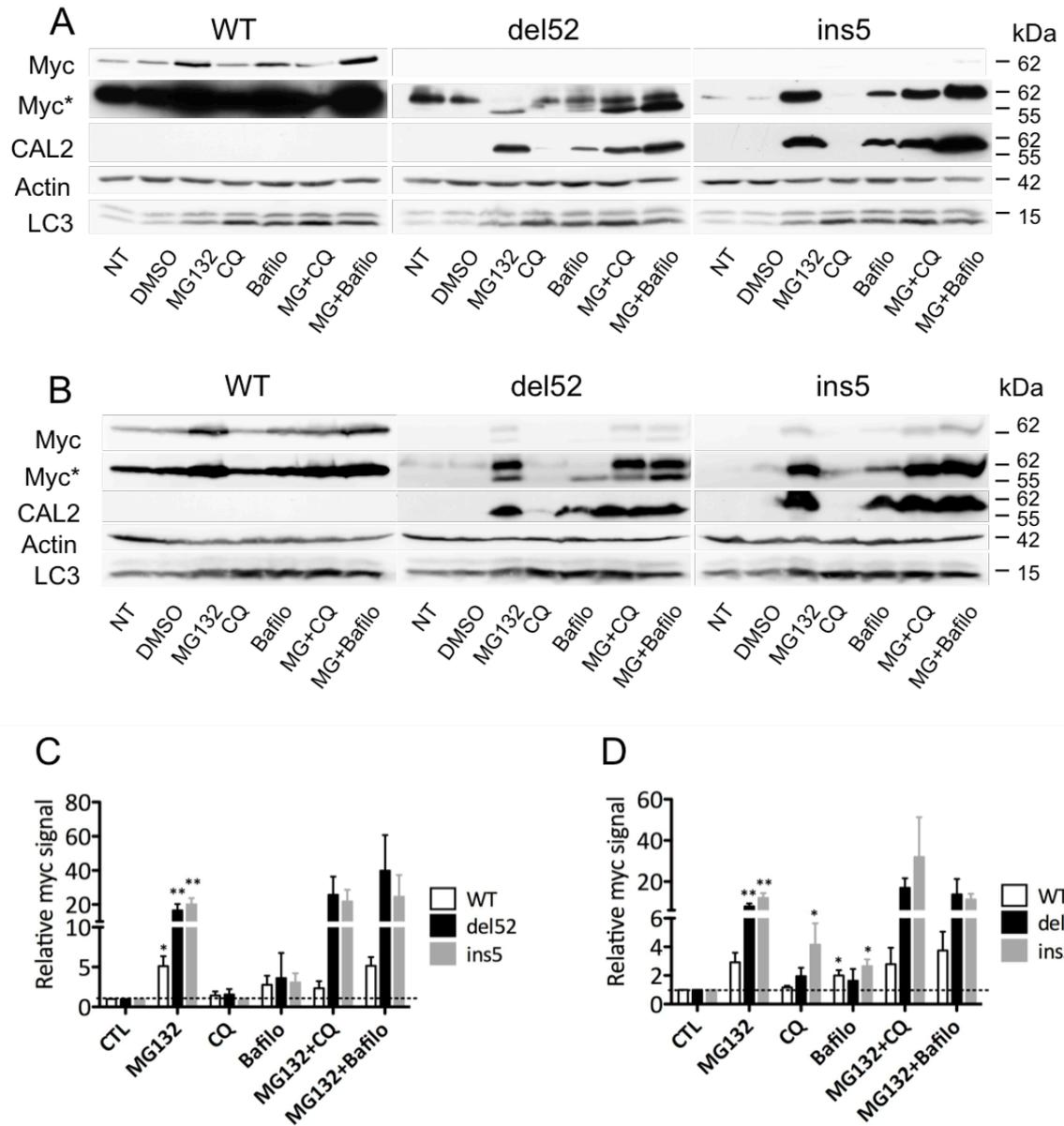


Figure 3: CALR mutant proteins are substrates of ERAD-proteasome and autophagy degradation pathways. HEK293T were transfected with pcDNA6 plasmids to express Myc-6xHis tagged WT or mutant CALR proteins. Cells were treated 24h by (A) MG-132 (10 μ M) or (B) chloroquine (CQ, 50 μ M) or Bafilomycine A1 (Bafilo, 100 nM) and CALR proteins expression was assessed by western-blotting with anti-Myc antibody. Actin was used as a loading control. Data presented are representative of 3 to 10 experiments. (C) UT-7 MPL cells were transduced with pCW57.1 lentiviral vectors to express Myc-6xHis tagged WT or mutant CALR proteins. Twenty four hours after doxycyclin treatment (2 μ g/mL), cells were treated by MG-132 (10 μ M), chloroquine (CQ, 50 μ M) or Bafilomycin 1A (Bafilo, 100 nM) for 24h. Cell lysates were analyzed by western-blot. Expression level of the different forms of CALR proteins was expressed as a ratio of Myc signal to actin signal and then normalized against the “not treated” or “DMSO” condition. Data are expressed as mean +/- SEM from 7 experiments. *p<0.05, **p<0.01

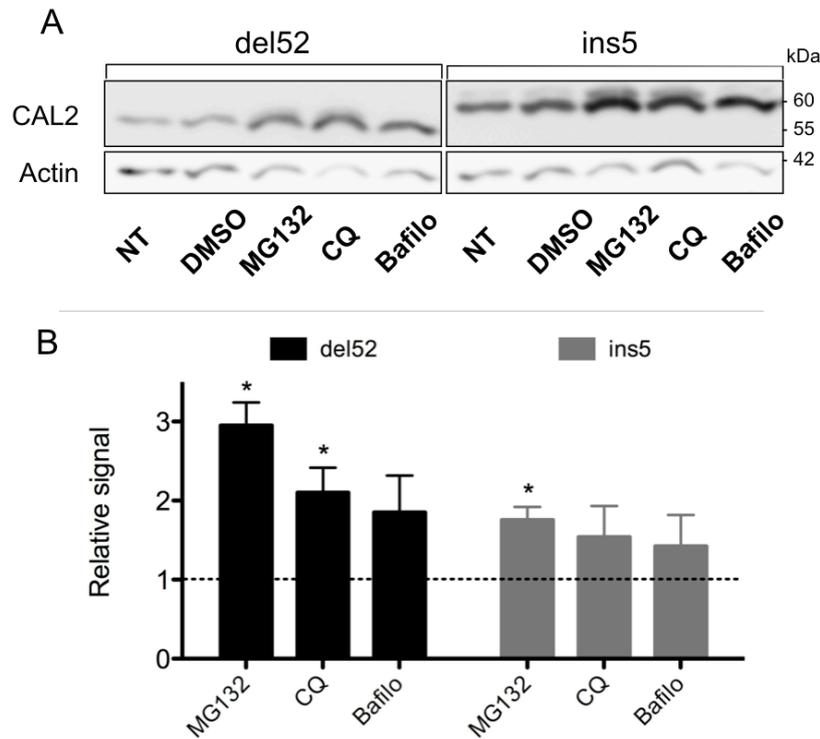


Supplemental Figure S4: CALR mutant proteins are substrates of ERAD-proteasome degradation pathways in hematopoietic cells.

Supplemental Figure S4: CALR mutant proteins are substrates of ERAD-proteasome degradation pathways in hematopoietic cells.

UT-7 MPL (A) and DAMI (B) were transduced with pCW57.1 lentiviral vectors to express C-terminus Myc-6xHis tagged WT or mutant CALR proteins. Twenty four hours after doxycyclin treatment (2 μ g/mL), cells were treated by MG-132 (10 μ M), chloroquine (CQ, 50 μ M), Bafilomycin 1A (Bafilo, 100 nM) or combination for 24h. Cell lysates were analyzed by western-blot. The transduced CALR were detected using the Myc tag epitope. CALR mutants were also detected using CAL2 antibody specific of the C-terminal neo-epitope generated by the frameshift mutations. Actin serves as a loading control. Data presented are representative of 7 experiments. Myc* denotes for a longer exposure for anti-Myc antibody revelation. DMSO was used as a vehicle control for MG-132 and bafilomycine A1. NT denotes the “Not Treated” condition. For del52 mutants, 2 bands are detected with the anti-Myc antibody, the upper band corresponding to a non-specific signal and the lower one corresponding to the mutant protein as confirmed by revelation with CAL2 antibody. Expression level of the different forms of CALR proteins in UT-7 MPL (C) and DAMI (D) was quantify. Results are expressed as a ratio of Myc signal to actin signal and then normalized against the “not treated” or “DMSO” condition. Data are expressed as mean +/- SEM from 7 experiments. *p<0.05, **p<0.01

In order to ensure that the identified excessive degradation was not due to the presence of the Myc-6xHis tag, the same experiments were performed in HEK293T cells transfected with plasmids encoding for non-tagged mutant CALR (Fig. S5), MG-132, chloroquine and bafilomycin increased the expression of the del52 variant by mean factors of 2.9, 2.1 and 1.9 ($p=0.014$, $p=0.0397$ and $p=0.14$ respectively). Only MG-132 increased the expression of ins5 mutant with a mean factor increase of 1.8 ($p=0.0323$). To determine if the lysosomal degradation pathway was involved in mutant CALR degradation, transfected HEK293T cells were treated with a protease inhibitor cocktail (cOmplete™, Fig. 4A-B). This treatment did not significantly increase CALR variants expression. We also raised the hypothesis that mutant CALR could behave as partially misfolded proteins subjected to quality control mechanisms. In this case, one should expect TUDCA and 4-PBA to act as chemical chaperones, and reduce their degradation. Interestingly, neither TUDCA nor 4-PBA did produce a significant effect (Fig. 4A-B), suggesting that CALR variants may be recognized as terminally misfolded proteins. Altogether, these experiments suggest that CALR mutant proteins are degraded, that the proteasome and to a lower extent the autophagy pathways are at play in this phenomenon and that the expression of mutant proteins can be restored to levels similar to WT CALR protein when the proteasome is inhibited.

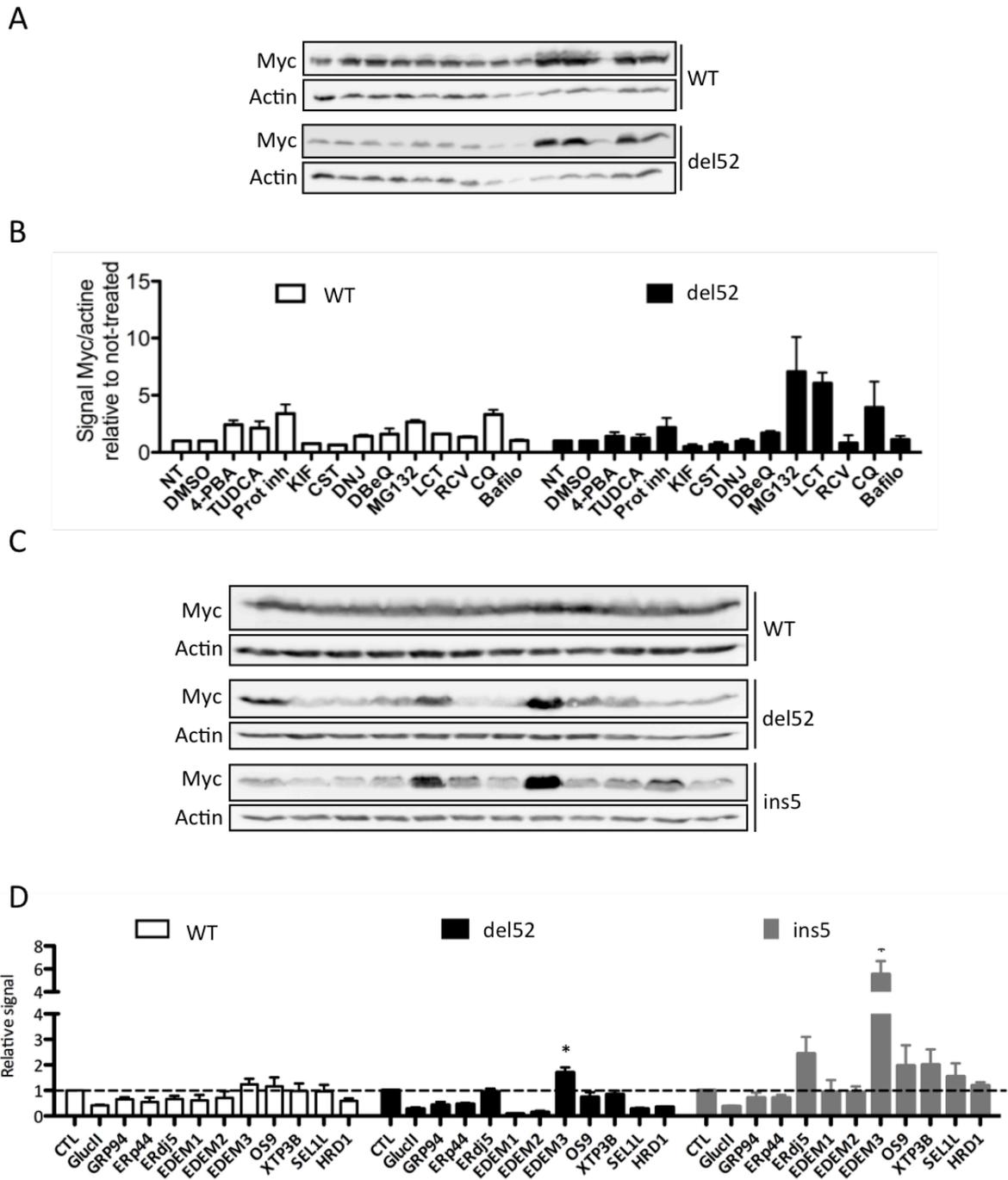


Supplemental Figure S5 : Targeting of CALR mutant proteins to the ERAD-proteasome pathway is not due to the presence of the Myc-6xHis tag at the C-terminus end of the proteins.

(A) HEK293T were transfected with plasmids to express non-tagged mutant CALR proteins. Twenty four hours later, cells were treated by MG-132, chloroquine (CQ, 50 μ M) or Bafilomycin 1A (Bafilo, 100 nM) for another 24h. The expression of the proteins was assessed by western-blotting using the CAL2 antibody specific of the neo-epitope generated by the frameshift mutations. Actin serves as a loading control. (B) Quantification results are expressed as a ratio of Myc signal to actin signal and then normalized against the “not treated” or “DMSO” condition. Data are expressed as mean +/- SEM from 5 experiments. * p<0.05

Mechanisms of CALR variants targeting to ERAD

To get more insight into the molecular mechanisms involved in the targeting of CALR mutant proteins to the ERAD-proteasome pathway, HEK293T cells were treated with drugs affecting various steps of this pathway. Neither glucosidase inhibitors (Castanospermin, 1-Deoxynojirimycin), nor the mannosidase inhibitor (Kifunensin), the p97 inhibitor DBeQ or Roscovitin (previously shown to increase the expression ERAD-substrate CFTR Δ 508(21)) affected mutant CALR degradation (Fig. 4A-B). These results suggested that recognition of a glycan motif is not involved in the recognition of mutant CALR proteins as a substrate for the ERAD pathway and that the proteasome-mediated degradation may not require the AAA+ ATPase p97. To further characterize the ERAD dependent intermediates involved in the degradation of CALR variants, we carried out an ERQC/ERAD targeted siRNA screen in HEK293T cells and evaluated the potential stabilization of del52 and ins5 CALR mutants. Among the candidates tested, EDEM3 was identified as a key player in the degradation of both CALR mutants (Fig. 4C-D). Indeed, EDEM3 silencing led to a 1.7-fold ($p=0.0278$) and a 5.5-fold ($p=0.0171$) increase in the expression of the del52 and ins5 mutants, respectively. The effect of EDEM3 silencing on WT CALR was lower with a mean increase of 1.5-fold ($p=0.05$). Of note, glucosidase II silencing did not increase mutant CALR expression levels thereby confirming that recognition of these proteins as ERAD-substrate was glycan-independent.



**Figure 4 : EDEM3 is a key player for targeting CALR mutants to the ERAD-
proteasome pathway**

Figure 4 : EDEM3 is a key player for targeting CALR mutants to the ERAD-proteasome pathway

(A) HEK293T were transfected with pcDNA6 plasmids to express Myc-6xHis tagged WT or mutant CALR proteins. Twenty-four hours after, they were treated for another 24h. CALR expression was then assessed by western-blotting via the Myc epitope. Actin serves as a loading control. Each lane corresponds to a drug as indicated in (B) and with the same order. (B) The expression of WT and del52 mutant of CALR was assessed and expressed as Myc signal divided by actin signal then normalized against the “not treated” or “DMSO” condition. The results presented represent mean +/- SEM determined in 2 independent experiments. NT: Not treated, 4-PBA : 4-phenylbutyrate, TUDCA: Tauroursodesoxycholic acid, Prot inh: cOmplete™ protease inhibitors, KIF: Kifunensin, CST: Castanospermin, DNJ: 1-Deoxynojirimycin, LCT: Lactacystin, RCV: Roscovitin, CQ: Chloroquine, Bafilo: Bafilomycin A1. DMSO was used as a vehicle control for all drugs except for 4-PBA, protease inhibitors, and chloroquine. (C) HEK293T were transfected with siRNA directed against different actors of the ERAD pathway. Forty-eight hours later, they were transfected with pcDNA6-CALR plasmids. Twenty-four hours later, cells were lysed before analysis by western-blotting. CALR proteins were detected via their Myc epitope and actin was used as a loading control. Each lane corresponds to a siRNA as indicated in (D) and with the same order. (D) The expression of the different forms of CALR secondary to ERAD actors silencing was quantified as in (B). The histograms represent mean +/- SEM determined in 3 to 6 independent experiments. *p<0.05

Targeting mutant CALR protein degradation could represent a therapeutic option for *CALR* mutated MPN patients

As previously shown (16,17,22), the expression of CALR mutants is associated with a gain of function responsible for a cytokine independent proliferation in UT-7 MPL cells (Fig. 5A). This functional effect was associated with the activation of the JAK-STAT pathway as assessed by the phosphorylation of STAT5 in the absence of TPO only when del52 or ins5 CALR variants were expressed (Fig. S6). We sought to take advantage of the degradation pathway targeting CALR mutants to selectively impair the proliferation characteristics of the cells expressing these aberrant proteins. A first approach aimed at further reducing the amount of CALR mutant proteins in the cells through the overexpression of EDEM3, in order to rid the cells of CALR variants able to trigger proliferation in the absence of cytokine. To this end, UT-7 MPL expressing WT or mutant CALR proteins were transduced with lentiviral vectors to over-express a human Flag-tagged EDEM3 or a control empty vector. Despite the expression of the transgene (Fig. 5B), we did not observe any decrease in cell proliferation, regardless of the presence or absence of TPO (Fig. 5C). The second approach was to inhibit CALR mutant degradation in order to reach a threshold above that the aberrant protein could exert toxic effects.

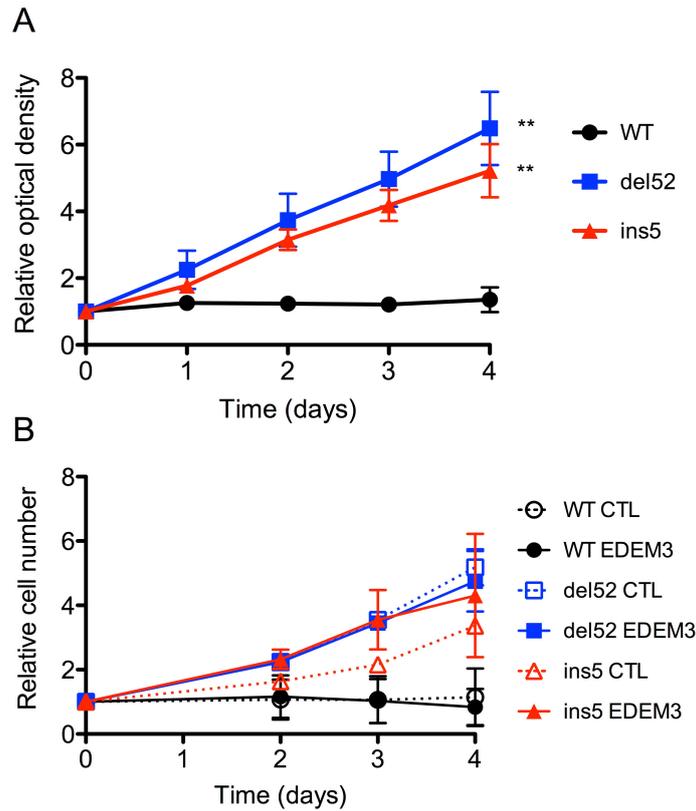
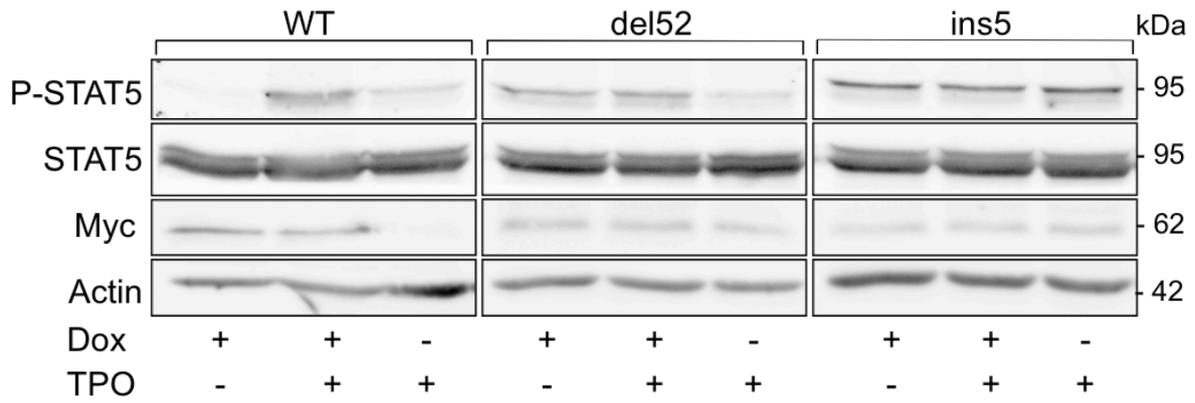


Figure 5: CALR mutant proteins confere independence toward cytokine regulation.

(A) Proliferation of UT-7 MPL was assessed after induction of the different forms of CALR, and in the absence of TPO. Cell proliferation was determined by the OD after reaction with MTS. Results are expressed as the OD determine during each day, divided by the corresponding OD at D0. The graph represents the results as mean +/- SEM of 6 independent experiments. **: $p < 0.01$

(B) Proliferation of UT-7 MPL was assessed after induction of the different forms of CALR in the absence of TPO and in presence of EDEM3 overexpression (EDEM3) or not (CTL). Cell proliferation was determined by flow cytometry after Annexin V / DAPI labelling. Results are expressed as the cell number measured at each time relative to day 0. The graph represent the results as mean +/- SEM of 3 independent experiments.



Supplemental Figure S6 :

UT-7 MPL were washed 4 times before being cultured in presence or absence of Doxycyclin (to induce the expression of different forms of CALR), and in presence or absence of TPO. Twenty four hours later, they were lysed, and phosphorylation of STAT5 was assessed by western-blotting. The expression of CALR transgenes was also assessed, but at least for del52 mutant, the band observed correspond to a non-specific signal because it does not present with the expected molecular weight.

Discussion

In this study, we have determined the impact of the expression of variant forms of CALR protein on the homeostasis of the ER and searched for the mechanisms involved in their low expression level.

We have shown that expression of mutant CALR proteins associated with MPN does not trigger an ER stress contrary to what was suggested by transcriptomic analyses.(23) Moreover, we revealed that cells expressing these variants are as sensitive to ER stress-induced apoptosis as cells expressing the WT CALR. These results are consistent with the absence of benefit of proteasome inhibitor bortezomib in the treatment of PMF patients. (24,25)

The low level expression of CALR mutant proteins compared to their WT counterpart have previously been reported(16,17,26), but the mechanisms explaining this phenomenon have not been addressed comprehensively. As other groups, we have shown that CALR variant proteins do not leak massively into the extra-cellular medium due to the loss of their ER retention motif.(26,27) Treatment of cell lines with 2 different proteasome inhibitors revealed that these variant proteins are subjected to degradation via the ERAD-proteasome pathway. This process is not the consequence of the presence of a tag at the C-terminus of the proteins since 1) increased level of CALR mutant have been observed after MG132 treatment in another study using N-terminal tagged forms of CALR(28), 2) low expression levels have been observed in primary cells expressing endogenous (thus non-tagged) mutant CALR proteins, 3) a similar effect has been noticed after transfection of plasmids encoding non-tagged proteins in HEK293T cells. Inhibition of autophagy has shown moderate effects on mutated CALR expression and discrepancies have been noticed depending on the drug and the cell line used. Moreover we did not notice a robust and reproducible additive effect of autophagy + proteasome inhibition over proteasome inhibition alone, suggesting a limited role of autophagy in CALR variants clearance. It is possible that the contribution of autophagy could be restricted to situations of saturation of the ERAD pathway, as previously shown in other models. (29)

The features allowing CALR variants to be recognized as substrates for the ERAD machinery are not known. Mammalian CALR protein presents a single N-glycosylation site, but an effective glycosylation is detected only in stress conditions.(30) Therefore it is not surprising that glycan motifs are not involved in the degradation process of CALR variants as suggested by the absence of effect of glucosidase and mannosidase inhibition (by

pharmacological and molecular means). Our molecular screen using siRNA shows that this destruction does not involve the classical ERAD machinery for soluble ER luminal proteins (ie OS-9, XTP3-B, SEL1L, HRD1). Moreover, DBE4 failed to increase the expression levels of mutated CALR suggesting that p97 is not an actor of CALR variants disposal, even though it is involved in the degradation of a large variety of ERAD substrates.(31) Nevertheless we highlighted EDEM3 as a key component in the mutated CALR protein degradation pathway. Moreover, the absence of effect of kifunensine treatment suggests that its mannosidase activity is dispensable for this process. Concordantly, the knock-down of EDEM2 acting upstream EDEM3 in mannose chain trimming(32) has no effect on the expression level of del52 and ins5 mutants. EDEM3, like other members of the EDEM family, has previously been shown to interact with non-glycosylated substrates. (33,34) However, its role in the degradation of proteins has been limited to glycosylated substrates thus far. The identity of the other factors involved in CALR mutated protein disposal remains unknown, but our data confirm the existence of a specific equipment dedicated to the degradation of non-glycosylated substrates as previously suggested. (35)

Activation of the degradation of misfolded proteins has been studied as a therapeutic option, particularly in neurodegenerative diseases.(36,37) In a similar way, we reasoned that increasing the clearance of CALR variants could lower their expression below a threshold allowing them to trigger cell proliferation.

In a different approach, we aimed at stabilizing mutated CALR proteins by inactivating EDEM3 in order to evaluate if the degradation pathway highlighted was part of the pathophysiology associated with *CALR* mutations, and if it could represent a therapeutic target.

Acknowledgements

We thank Valerie De luca, Anaëlle Stum and Vincent Pitard for technical assistance with Flow cytometry (CNRS UMS 3427, INSERM US 005, Univ. Bordeaux, 33000 Bordeaux, France) and the Vectorology facility of the University of Bordeaux. We also thank the CRB cancer of the University Hospital of Bordeaux for providing patients samples.

This work was supported by grants from Cancéropôle Grand Sud-Ouest and la Ligue Contre le Cancer to EL and Institut National du Cancer (INCa_5869, INCa_7981, PLBIO: 2015-111), la Ligue Contre le Cancer and EU H2020 MSCA ITN-675448 (TRAINERS) to EC. OM was supported by a PhD fellowship from the French Research and Education ministry.

References

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
2. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 28 avr 2005;434(7037):1144-8.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 28 avr 2005;352(17):1779-90.
4. 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*. 19 mars 2005;365(9464):1054-61.
5. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. avr 2005;7(4):387-97.
6. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. juill 2006;3(7):e270.
7. 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*. 19 déc 2013;369(25):2379-90.
8. 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*. 19 déc 2013;369(25):2391-405.
9. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J*. 1 févr 2009;417(3):651.
10. Williams DB. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 15 févr 2006;119(Pt 4):615-23.
11. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J*. 1 déc 1999;344 Pt 2:281-92.
12. Lamriben L, Graham JB, Adams BM, Hebert DN. N-Glycan-based ER Molecular Chaperone and Protein Quality Control System: The Calnexin Binding Cycle. *Traffic Cph Den*. avr 2016;17(4):308-26.
13. Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. déc 2008;9(12):944-57.

14. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:739-89.
15. Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol.* juill 2015;17(7):829-38.
16. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu R-I, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood.* 10 mars 2016;127(10):1325-35.
17. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 10 mars 2016;127(10):1307-16.
18. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods.* août 2014;11(8):783-4.
19. Mansier O, Migeon M, Saint-Lézer A, James C, Verger E, Robin M, et al. Quantification of the Mutant CALR Allelic Burden by Digital PCR: Application to Minimal Residual Disease Evaluation after Bone Marrow Transplantation. *J Mol Diagn.* janv 2016;18(1):68-74.
20. Fessart D, Domblides C, Avril T, Eriksson LA, Begueret H, Pineau R, et al. Secretion of protein disulphide isomerase AGR2 confers tumorigenic properties. *eLife.* 30 mai 2016;5.
21. Norez C, Vandebrouck C, Bertrand J, Noel S, Durieu E, Oumata N, et al. Roscovitine is a proteostasis regulator that corrects the trafficking defect of F508del-CFTR by a CDK-independent mechanism. *Br J Pharmacol.* nov 2014;171(21):4831-49.
22. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood.* 10 mars 2016;127(10):1317-24.
23. Lau WWY, Hannah R, Green AR, Göttgens B. The JAK-STAT signaling pathway is differentially activated in CALR-positive compared with JAK2V617F-positive ET patients. *Blood.* 5 mars 2015;125(10):1679-81.
24. Barosi G, Gattoni E, Guglielmelli P, Campanelli R, Facchetti F, Fisogni S, et al. Phase I/II study of single-agent bortezomib for the treatment of patients with myelofibrosis. Clinical and biological effects of proteasome inhibition. *Am J Hematol.* août 2010;85(8):616-9.
25. Mesa RA, Verstovsek S, Rivera C, Pardanani A, Hussein K, Lasho T, et al. Bortezomib therapy in myelofibrosis: a phase II clinical trial. *Leukemia.* août 2008;22(8):1636-8.
26. Garbati MR, Welgan CA, Landefeld SH, Newell LF, Agarwal A, Dunlap JB, et al. Mutant calreticulin-expressing cells induce monocyte hyperreactivity through a paracrine mechanism. *Am J Hematol.* févr 2016;91(2):211-9.
27. Han L, Schubert C, Köhler J, Schemionek M, Isfort S, Brümmendorf TH, et al.

Calreticulin-mutant proteins induce megakaryocytic signaling to transform hematopoietic cells and undergo accelerated degradation and Golgi-mediated secretion. *J Hematol Oncol*. 13 mai 2016;9(1):45.

28. Kollmann K, Warsch W, Gonzalez-Arias C, Nice FL, Avezov E, Milburn J, et al. A novel signalling screen demonstrates that CALR mutations activate essential MAPK signalling and facilitate megakaryocyte differentiation. *Leukemia*. avr 2017;31(4):934-44.

29. Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagai H, Misutani A, Matsuda C, et al. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet*. 15 mars 2007;16(6):618-29.

30. Rizvi SM, Mancino L, Thammavongsa V, Cantley RL, Raghavan M. A polypeptide binding conformation of calreticulin is induced by heat shock, calcium depletion, or by deletion of the C-terminal acidic region. *Mol Cell*. 24 sept 2004;15(6):913-23.

31. Bernasconi R, Galli C, Calanca V, Nakajima T, Molinari M. Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates. *J Cell Biol*. 25 janv 2010;188(2):223-35.

32. Ninagawa S, Okada T, Sumitomo Y, Kamiya Y, Kato K, Horimoto S, et al. EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *J Cell Biol*. 4 août 2014;206(3):347-56.

33. Tang H-Y, Huang C-H, Zhuang Y-H, Christianson JC, Chen X. EDEM2 and OS-9 are required for ER-associated degradation of non-glycosylated sonic hedgehog. *PloS One*. 2014;9(6):e92164.

34. Sato T, Sako Y, Sho M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, et al. STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. *Mol Cell*. 13 juill 2012;47(1):99-110.

35. Okuda-Shimizu Y, Hendershot LM. Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Mol Cell*. 30 nov 2007;28(4):544-54.

36. Leestemaker Y, de Jong A, Witting KF, Penning R, Schuurman K, Rodenko B, et al. Proteasome Activation by Small Molecules. *Cell Chem Biol*. 22 juin 2017;24(6):725-736.e7.

37. Lee B-H, Lee MJ, Park S, Oh D-C, Elsasser S, Chen P-C, et al. Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*. 9 sept 2010;467(7312):179-84.

2. Résultats complémentaires

Rapidement après la découverte des mutations de CALR, une équipe italienne a développé un anticorps permettant de détecter spécifiquement les formes mutées de la protéine. Son utilisation en immunohistochimie a révélé une expression importante et assez spécifique dans le compartiment mégacaryocytaire. (Vannucchi et al., 2014) Ces données ont par la suite été confirmées par d'autres groupes. (Stein et al., 2015) Ces observations nous ont amenés à déterminer l'impact de la différenciation mégacaryocytaire sur l'expression des formes variantes de CALR. Une stabilisation de ces protéines spécifiquement dans cette voie de différenciation pourrait en effet participer à la spécificité de leur action oncogénique sur ce compartiment cellulaire.

Comme pour nos lignées cellulaires, nous avons dans un premier temps vérifié le niveau d'expression des ARNm des formes mutées de CALR par PCR digitale au niveau des plaquettes de patients. Les résultats ont été comparés aux charges alléliques déterminées sur ADN de polynucléaires neutrophiles, paramètre habituellement utilisé pour estimer la taille du clone malin. De manière inattendue les charges alléliques déterminées sur matériel plaquettaire sont significativement inférieures à celles déterminées sur ADN de polynucléaires au moins chez les patients présentant un clone « hétérozygote » (Figure 21A). Dans la mesure où un seul patient présentant un statut « homozygote » a été examiné, toute conclusion définitive concernant ce type de patients semble prématurée. Néanmoins chez ce patient, la charge allélique déterminée sur ARN plaquettaire était parfaitement comparable à celle mesurée sur ADN de cellules granuleuses (Figure 21B). En conclusion, il ne semble pas exister de stabilisation des ARNm dans les cellules dérivées de mégacaryocytes, ni d'enrichissement du clone malin dans les cellules issues de la différenciation mégacaryocytaire. A l'inverse de ce que nous avons observé sur ARN de leucocytes totaux, il semble même exister une déstabilisation des ARNm des formes mutées de CALR dans les plaquettes.

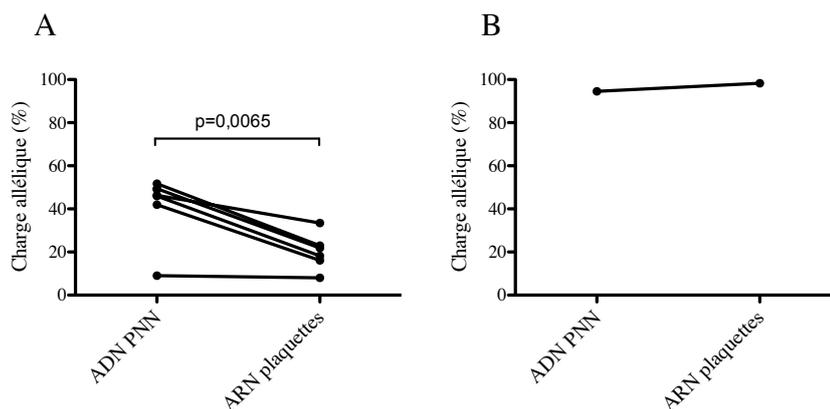


Figure 21 : Comparaison des charges alléliques des mutants *CALR* déterminées sur ADN de polynucléaires neutrophiles et ARN plaquettaires.

Les charges alléliques *CALR* ont été déterminées par PCR digitale sur ADN extraits de polynucléaires neutrophiles (ADN PNN) et ARN plaquettaires (ARN plaquettes) pour des patients présentant des mutations de type 1 (délétion de 52pb, A) et de type 2 (insertion de 5 pb, B). Dans les 2 cas, les 2 populations cellulaires ont été purifiées à partir du même prélèvement.

L'existence d'une interaction aberrante des protéines mutantes *CALR* avec des récepteurs aux cytokines était l'une de nos hypothèses initiales de travail. Si le rôle de *MPL* dans la signalisation oncogénique de ces protéines mutantes a depuis été mis en évidence, nous souhaitons évaluer un éventuel effet réciproque. Nous avons ainsi recherché si la simple co-expression de *MPL* avec les protéines *CALR* mutées pouvait stabiliser ces dernières. Pour ce faire nous avons transfecté des HEK293T avec le plasmide pcDNA6 permettant l'expression des différentes formes de *CALR* conjointement avec notre plasmide lentiviral permettant l'expression du récepteur à la thrombopoïétine (*MPL*). Comme montré dans la Figure 22, l'expression de *MPL* n'augmente pas l'expression des protéines mutantes *CALR* de type 1 et de type 2.

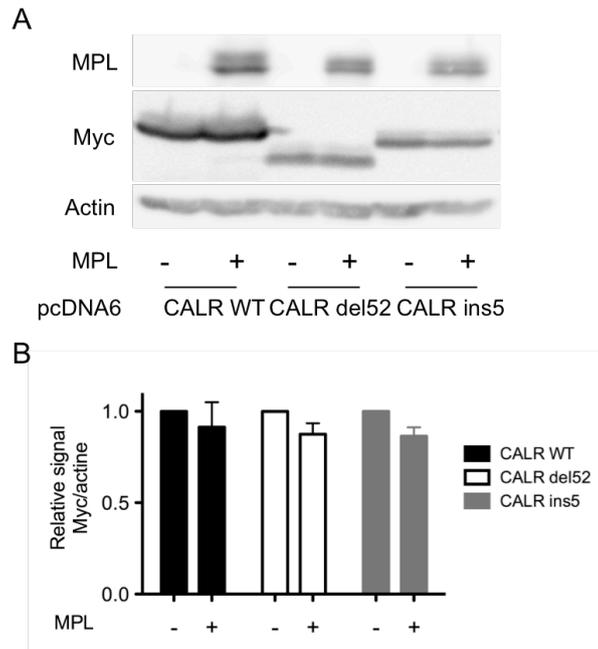


Figure 22 : La co-expression de MPL ne stabilise pas les formes mutantes de CALR.

Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les plasmides permettant l'expression des différentes formes de CALR et un plasmide permettant l'expression de MPL (+ MPL) ou un plasmide contrôle vide (-MPL). (A) Quarante-huit heures après transfection, les cellules ont été lysées et l'expression des différentes protéines analysées par western-blot. L'expression des protéines CALR a été révélée *via* leur épitope Myc. L'actine sert de contrôle de charge. (B) L'expression des différentes formes de CALR a été quantifiée par densitométrie et normalisée sur l'expression observée en présence du vecteur contrôle vide (-MPL). Le graphique représente la moyenne +/- SEM des valeurs obtenues au cours de 4 expériences indépendantes.

Le modèle cellulaire utilisé et la simple expression d'un récepteur aux cytokines ne pouvant récapituler la différenciation mégacaryocytaire, nous avons poursuivi nos investigations en forçant la différenciation de lignées cellulaires hématopoïétiques présentant des caractéristiques mégacaryocytaires basales (DAMI) ou non (K562). Ceci a été réalisé en traitant les cellules avec du Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) à une concentration de 1nM (DAMI) ou 80nM (K562). Une condition contrôle a été réalisée en présence de DMSO, le solvant du PMA. L'efficacité de la différenciation induite par ce traitement a été évaluée en cytométrie en flux par la détermination de la moyenne de fluorescence du CD41, marqueur membranaire spécifique du compartiment mégacaryocytaire. L'expression des différentes formes de CALR a été induite dès le J0 par traitement des cellules par de la doxycycline à 2 µg/mL. Dans les K562 comme dans les DAMI, le PMA a efficacement induit une différenciation mégacaryocytaire (Figure 23). De plus dans les K562 cette drogue a significativement augmenté les niveaux des protéines CALR mutées de type 1 et de type 2

sans impacter celui de la protéine sauvage (Figure 23). Cet effet n'a cependant pas été retrouvé dans les DAMI.

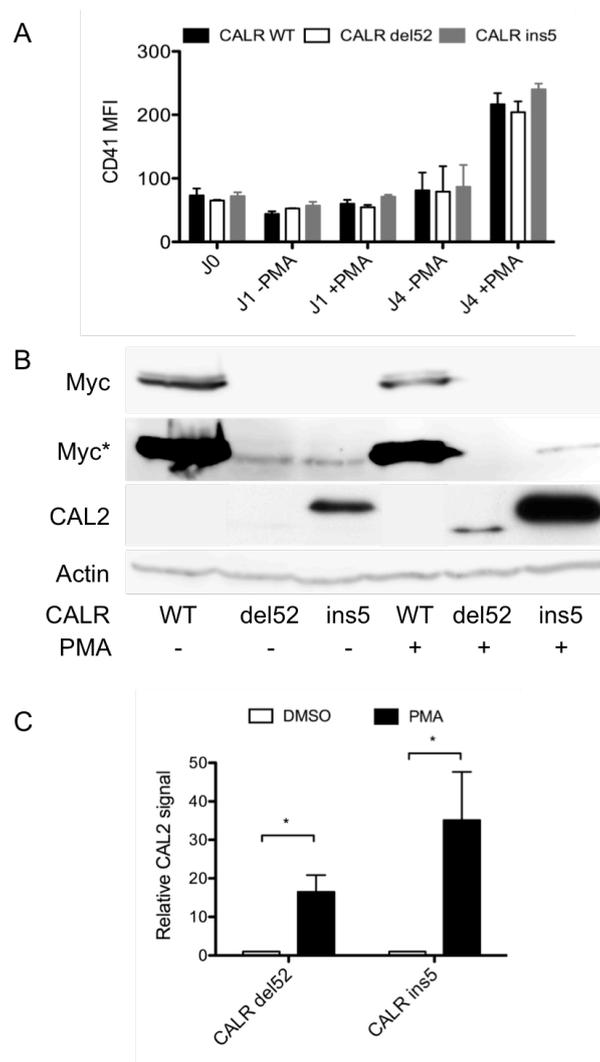


Figure 23 : Effet de la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562 sur l'expression de protéines mutantes CALR.

Les cellules K562 ont été traitées pendant 4 jours par du PMA à 80nM. (A) L'efficacité de la différenciation a été évaluée par l'augmentation d'expression du CD41 à la surface des cellules par cytométrie en flux. Le graphique représente les moyennes de fluorescence observées au temps J0, J1 et J4 en présence de PMA (+PMA) ou de DMSO (-PMA). Les résultats représentent la moyenne +/- SEM de 2 expériences indépendantes. (B) Après 4 jours de traitement, les cellules ont été lysées et l'expression des différentes formes de CALR évaluée par western-blot. La révélation de ces protéines a été effectuée *via* leur épitope myc ou avec un anticorps spécifique des formes mutées de CALR (CAL2). L'actine est utilisée comme contrôle de charge. Myc* représente une exposition prolongée après marquage avec l'anticorps Myc (C) Le niveau d'expression des mutants de CALR a été évalué par densitométrie et normalisé sur l'expression de l'actine pour chaque condition. Les résultats représentent la moyenne +/- SEM de 6 expériences indépendantes. * : $p < 0,05$

Pour expliquer cette discordance, nous avons évalué l'expression des ARNm des formes mutées de CALR après 4 jours de traitement par du PMA. Dans les DAMI, nous avons observé une diminution significative de la charge allélique comparativement aux niveaux d'expression observés après 24h de traitement par doxycycline. Dans cette lignée, pour la mutation de type 1, les niveaux d'expression des ARNm étaient comparables entre les conditions « différenciation » et « contrôle » tandis que pour la mutation de type 2, une légère augmentation de l'expression a été observée dans la condition « différenciation ». Au contraire, dans les K562, l'expression des ARNm des formes mutées de CALR était diminuée dans la condition « contrôle » alors que dans la condition « différenciation », la charge mutationnelle sur ARNm était significativement augmentée (comparativement au niveau observé après 24h d'induction des transgènes et comparativement à la condition « contrôle », Figure 24). L'effet observé au niveau protéique dans les K562 ne semble donc pas lié à une stabilisation des protéines mais plutôt une stabilisation des ARNm sans que le mécanisme ne soit connu à ce jour.

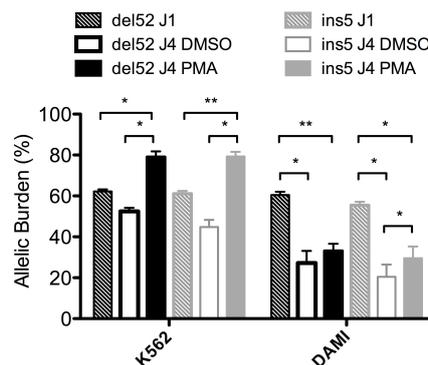


Figure 24 : Niveaux d'expression des ARNm des formes mutées de CALR (type 1 et type 2) déterminés par PCR digitale après traitement des cellules par PMA ou DMSO.

Quatre jours après traitement, les ARNm ont été extraits, traités par de la DNase, rétro-transcrits et analysés par PCR digitale. Les résultats représentent le nombre de copies d'ARNm de la forme mutée de CALR divisé par le nombre total de copies d'ARNm CALR (sauvage+muté). La charge mutationnelle déterminée à J1 correspond aux résultats observés au cours d'autres expériences, 24h après traitement par doxycycline, mais en absence de DMSO et de PMA. Le graphique représente la moyenne de la charge allélique +/- SEM de 3 expériences indépendantes. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$

Finalement, pour répondre plus précisément à la question posée, nous avons comparé les niveaux d'expression des protéines CALR mutantes dans des cellules CD34⁺ (isolées de sang placentaire) différenciée vers les lignées granuleuse, érythroïde ou mégacaryocytaire. Pour ce faire, ces cellules ont été transduites avec les vecteurs pCW57.1 permettant l'expression inductible des différentes formes de CALR. Une sélection des cellules transduites a été réalisée en les cultivant 3 jours en milieu StemSpan SFEM en présence de puromycine et de SCF, TPO, Flt3-L (50 ng/mL chacun), IL3 (10 ng/mL), Stemregénine (1 µM) et acide valproïque (1mM) afin de les amplifier tout en conservant un état non différencié. La différenciation vers la lignée érythroïde a ensuite été obtenue en ajoutant aux cellules le cocktail suivant : SCF (50 ng/mL), IL3 (5 ng/mL), EPO (5 U/mL), Dexaméthasone (10⁻⁶M), Holotransferrine (1mg/mL). La différenciation vers la lignée granuleuse a été stimulée par l'ajout de GM-CSF (10 ng/mL) et de SCF (25 ng/mL) tandis que la différenciation mégacaryocytaire a été obtenue en traitant les cellules par de la TPO (50 ng/mL). L'expression des transgènes a été induite 24h avant la lyse des cellules par traitement à la doxycycline (2 µg/mL). Comme illustré dans la Figure 25, les formes mutantes de CALR sont restées indétectables dans la condition « mégacaryocytaire », tandis qu'elles étaient exprimées à plus ou moins faible niveau dans les autres conditions.

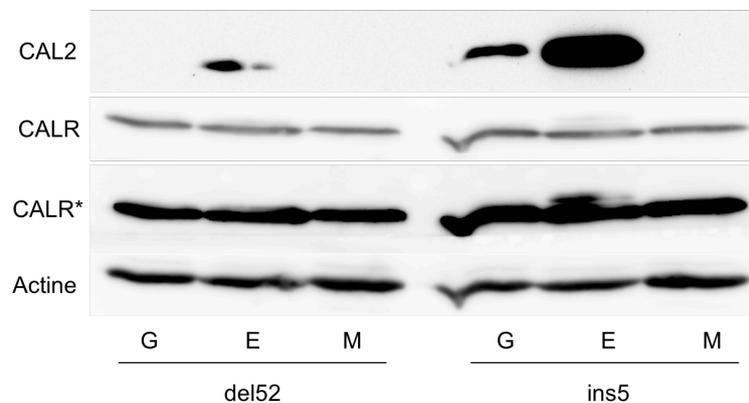


Figure 25 : Expression des formes mutées de CALR après différenciation de cellules primaires CD34⁺ vers différents lignages.

Après transduction, les cellules CD34⁺ ont été sélectionnées puis différenciées vers les lignées granuleuses (G), érythroïdes (E) ou mégacaryocytaires (M). Vingt-quatre heures avant la lyse, l'expression des transgènes a été induite par traitement à la doxycycline (2 µg/mL). L'expression des CALR mutées a été évaluée avec un anticorps spécifique des formes mutées (CAL2). Le niveau de CALR endogène a été déterminé avec un anticorps anti-CALR totale. L'actine sert de contrôle de charge. CALR* signale une révélation avec l'anticorps anti-CALR totale pendant un temps plus long.

L'ensemble de ces résultats suggère que la différenciation mégacaryocytaire en tant que telle ne stabilise pas de manière notable les protéines CALR mutées.

DISCUSSION

DISCUSSION

I. Discussion de l'article 1

L'intérêt de la détermination précise des charges alléliques dans les SMP a largement été démontré pour la mutation *JAK2V617F*. La découverte récente des mutations de *CALR* dans les TE et MFP a fourni pour les patients un marqueur diagnostique important. Cependant, l'intérêt de la détermination des charges mutationnelles *CALR* reste encore à démontrer. L'une des raisons à cela pourrait être l'utilisation fréquente en pratique courante de techniques de criblage ne permettant pas de déterminer ce paramètre (séquençage Sanger, HRM) ou avec une précision probablement sub-optimale (analyse de fragments). De fait, seules quelques études ont recherché une corrélation entre la présentation clinico-biologique des patients et leurs charge allélique *CALR*. La seule donnée confirmée reste que ces charges mutationnelles sont significativement plus élevées dans les MFP comparativement aux TE. (Andrikovics et al., 2014; Cabagnols et al., 2014) Cette observation semble faire le parallèle avec ce qui est observé pour *JAK2V617F* (Lippert et al., 2006), cependant dans le cas des mutations de *CALR*, les valeurs observées sont globalement beaucoup plus homogènes et l'homozygotie (définie comme une charge allélique supérieure à 60%) reste très rare pour les 2 maladies. Si l'on considère uniquement les patients atteints de MFP, le constat est encore plus frappant, la quasi-totalité des patients présentant une charge allélique de 50%. Ainsi, le fait que les patients atteints de TE présentent en moyenne des charges alléliques *CALR* inférieures à ceux atteints de MFP reflète une plus grande dispersion des valeurs observées dans le premier groupe, avec une estimation que 5-20% d'entre eux environ présentent une charge allélique faible (inférieure à 15-25% selon l'étude considérée), chose qui ne semble pas exister dans le cas des MFP. (Cabagnols et al., 2014; Jeromin et al., 2016; Jones et al., 2014) Cette proportion pourrait cependant être minorée par la sur-estimation des charges alléliques inférieures à 50% par l'analyse de fragments, technique utilisée dans ces 3 études. Pour la même raison, la corrélation hypothétique des charges mutationnelles *CALR* avec les paramètres de numération-formule sanguine est encore moins nette, puisque seule l'étude d'Andrikovics *et al* rapporte des résultats significatifs. Selon cette étude, les patients avec les charges alléliques *CALR* les plus élevées présenteraient des thrombocytoses et leucocytoses supérieures et des taux d'hémoglobine inférieurs. La confirmation (ou l'infirmer) de ces données nécessite l'utilisation d'une technique précise comme la PCR digitale que nous avons

développée. De la même manière, une caractérisation des patients présentant une mutation de *CALR* à faible taux impose l'utilisation d'une méthode de quantification fiable. Ces deux questions n'ont pas pu être investiguées clairement pour le moment du fait d'un trop faible effectif pour lequel la quantification de la charge allélique *CALR* par PCR digitale est disponible.

Un deuxième intérêt démontré de la quantification des charges mutationnelles dans les SMP (et les hémopathies en général) réside dans le suivi thérapeutique des patients. L'interféron α et l'allogreffe de moelle osseuse sont capables de faire diminuer drastiquement la taille du clone malin, jusqu'à le rendre indétectable. Ceci a largement été démontré pour *JAK2V617F*, et semble être valable également pour les mutations de *CALR*. (Cassinat et al., 2014; Haslam et al., 2014; Verger et al., 2015) Ces études ont utilisé l'analyse de fragments pour quantifier la taille du clone malin. La sensibilité offerte par cette technologie est évaluée dans le meilleur des cas à 1% (1,5%-3% dans notre cas). Dans une approche diagnostique, celle-ci semble amplement suffisante puisque dans notre expérience, aucun patient ne présente de charge allélique *CALR* inférieure à 10%. Néanmoins, la quantification des charges mutationnelles dans le but d'évaluer la maladie résiduelle requiert une technique plus sensible. C'est dans cette optique que nous avons développé notre technique de PCR digitale, comme l'ont fait parallèlement d'autres groupes avec des résultats assez comparables en terme de sensibilité. (Badbaran et al., 2016; Kjær et al., 2016; Mansier et al., 2016) Comme d'autres, nous avons démontré que les mutations de *CALR* deviennent indétectables après allogreffe pour la plupart des patients. Cependant, l'emploi d'une technique sensible nous a permis de détecter la réapparition de l'anomalie à un taux extrêmement faible (0,03%). Ceci n'aurait pas été possible avec une méthode telle que l'analyse de fragments. Si cela avait pu être réalisé de manière prospective, on peut imaginer qu'une intervention aurait pu être menée, notamment par l'injection de lymphocytes du donneur, évitant potentiellement la rechute du patient survenue quelques temps après.

La question de la détermination des charges mutationnelles sur ARN n'a pas encore été soulevée pour les mutations de *CALR* à ce jour. Notre expérience semble indiquer qu'il n'y a pas de différence majeure entre les valeurs observées sur ADN ou sur ARN. Du fait de la fragilité des ARN, dans le cadre d'une activité diagnostique une recherche des mutations de *CALR* sur ADN semble donc plus indiquée. Cependant, ces résultats nous apportent une information importante dans le cadre de notre travail sur la stabilité des protéines mutantes

CALR. Les faibles niveaux d'expression protéique observés ne sont ainsi pas liés à un défaut transcriptionnel, ou à une instabilité des ARNm. En effet, les mutations de *CALR* conduisant à des décalages du cadre de lecture, une dégradation des ARNm des formes mutantes aurait pu être observée, notamment via le système *Nonsense Mediated mRNA Decay*. (Lykke-Andersen and Jensen, 2015) Nous ne pouvons cependant pas exclure à ce jour un mécanisme de répression post-transcriptionnel, médié par exemple par des microARN.

II. Discussion de l'article 2

Dans ce travail, nous avons étudié l'impact de l'expression des protéines CALR mutantes sur l'homéostasie du RE avant d'étudier les raisons de leur faible expression dans les cellules. Ce dernier point est le résultat d'une dégradation par le système ERAD-proteasome et met en jeu la protéine EDEM3.

L'une des principales fonctions de la calréticuline est une participation au système de contrôle qualité des glycoprotéines sécrétées garantissant leur repliement correct avant export vers leur site d'activité. En cas de mise en défaut de ce système, une accumulation de protéines mal conformées est observée (situation dénommée stress du RE), à l'origine du déclenchement d'une réponse adaptative appelée UPR. Plusieurs raisons laissent présager une relation entre les mutations de CALR et cette réponse. La première est la mise en évidence dans une étude transcriptomique de l'activation de l'UPR chez les patients présentant ces mutations comparativement à des témoins sains. (Lau et al., 2015) Par ailleurs, le rôle du stress du RE dans la différenciation mégacaryocytaire (elle-même favorisée par les mutations de CALR) a récemment été suggéré. (Kollmann et al., 2017; Lopez et al., 2013; Marty et al., 2016) Cependant, que ce soit dans nos modèles de lignées cellulaires ou chez les patients testés, l'expression des formes mutantes de CALR ne perturbe pas de manière notable l'homéostasie du RE. En accord avec ces données, l'expression des variants de CALR ne modifie pas la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par un stress du RE. Ces résultats font écho à l'inefficacité du Bortezomib (un inhibiteur du protéasome) dans le traitement des MFP. (Barosi et al., 2010; Mesa et al., 2008) Une nuance doit cependant être apportée. Dans ces études, le statut mutationnel CALR des patients inclus n'est pas connu. On peut cependant imaginer que la plupart des patients non mutés pour JAK2 portaient une mutation de CALR. L'association de l'UPR avec les autres mutations responsables des SMP (JAK2V617F et MPLW515) et son rôle dans d'autres aspects comme la chimio-résistance restent à déterminer.

L'expression des protéines CALR mutées à un faible niveau est rapportée dans différentes études. (Araki et al., 2016; Chachoua et al., 2016; Garbati et al., 2016; Kollmann et al., 2017) Nous sommes cependant les premiers à démontrer que ce phénomène est également observé dans des cellules primaires de patients. Ceci a par ailleurs été suggéré par

l'absence de détection de la protéine mutée exprimée de manière endogène par la lignée MARIMO. (Kollmann et al., 2014) Il est donc peu probable que ceci soit le résultat d'un artefact lié à la présence d'étiquettes sur les protéines étudiées (utilisées dans toutes les études citées sauf celles de l'équipe de S. Constantinescu). Nos résultats suggèrent que ce faible niveau d'expression dans les cellules n'est pas le fait d'une hyper-sécrétion des protéines mutantes, comme cela aurait pu être imaginé du fait de la perte du motif de rétention dans le RE. La sécrétion d'une forme tronquée de CALR a été mise en évidence par Garbati et al (que ce soit en présence de CALR sauvage ou mutée), probablement en lien avec l'existence d'un site de clivage protéolytique au niveau C-terminal (Garbati et al., 2016; Wijeyesakere et al., 2011) Cette version courte et sécrétée de CALR présentant la même taille (et probablement la même séquence en acides aminés) quelle que soit la forme de la protéine exprimée dans les cellules (sauvage ou mutée), il est probable qu'elle n'ait pas de rôle dans la physiopathologie des SMP. Pour notre part, nous n'avons pas observé cette forme tronquée, notre tag en position C-terminal ayant probablement été éliminé par ce processus. Néanmoins, l'étude des surnageants de nos lignées hématopoïétiques avec notre anticorps anti-CALR totale ne nous a pas non plus permis d'observer cette protéine, comme cela semble être également le cas d'un autre groupe. (données non montrées, Han et al., 2016) De plus, aucune des études ayant investigué cette hypothèse n'a retrouvé de sécrétion massive des formes mutantes complètes. (Garbati et al., 2016; Han et al., 2016) La possibilité d'une rétention à la surface des cellules, via une interaction des variants de CALR avec MPL ne peut être exclue à ce jour. Cette hypothèse a d'ailleurs été avancée par différents groupes. (Araki et al., 2016; Vainchenker, 2016) Nous pouvons toutefois écarter que ce mécanisme soit responsable des faibles niveaux d'expression intracellulaire puisque l'étude par cytométrie en flux de cellules de patients présentant des mutations de CALR (progéniteurs et cellules matures) ne révèle pas de différence d'exposition de calréticuline à leur surface. (Daitoku et al., 2016; Nangalia et al., 2013)

Le traitement des cellules par deux inhibiteurs différents du protéasome (MG132 et lactacystine) démontre que les faibles niveaux d'expression des CALR mutantes sont le résultat de leur dégradation par le système ERAD-protéasome. Ce phénomène n'est pas le fait de la présence d'une étiquette en position C-terminal puisque le même phénomène est observé avec des protéines présentant un épitope Flag en position N-terminale (Kollmann et al., 2017) ou avec des formes non modifiées des protéines (notre étude). Cette dégradation semble au contraire être directement liée à la séquence du néopeptide C-terminal créé par le décalage de

cadre de lecture, puisque la délétion des résidus mutés des protéines de type 1 et de type 2 permet d'augmenter le niveau d'expression de celles-ci. (Garbati et al., 2016) Les traitements par chloroquine et bafilomycine A1 ont permis de bloquer efficacement le processus autophagique dans nos différents modèles cellulaires comme attesté par l'étude du LC3 par western-blot. Néanmoins, leur impact sur les niveaux d'expression des protéines CALR mutées était modéré et souvent discordant (entre les deux drogues et entre les lignées). Les raisons de ces différences restent inconnues à ce jour. Un effet additif avec le MG132 a par ailleurs été recherché dans nos lignées hématopoïétiques. Les résultats se sont cependant révélés trop peu reproductibles pour pouvoir se prononcer définitivement. L'implication de l'autophagie dans l'élimination des variants de CALR semble donc limitée. Son rôle pourrait ainsi être restreint aux situations où les capacités d'élimination par l'ERAD sont dépassées, comme cela a été démontré pour d'autres modèles. (Fujita et al., 2007)

Bien qu'associées à un gain de fonction, les mutations de CALR favorisent la dégradation des protéines oncogéniques qu'elles engendrent. La prise en charge d'une protéine favorisant une transformation tumorale par le système ERAD semble assez paradoxale, mais a déjà été observée (Marada et al., 2013) même si dans le cas de la protéine Smoothened (récepteur couplé à une protéine G dont des mutations sont décrites dans différents types de cancers), la dégradation est principalement observée dans des conditions de stress du RE (ce qui n'est pas le cas lors de l'expression de nos protéines mutantes).

L'hypothèse d'une dégradation par le système ERAD-protéasome semble pouvoir réconcilier les différentes études ayant recherché la localisation cellulaire des protéines CALR mutantes. Les conclusions contradictoires des groupes de T. Green et R. Kralovics (l'un rapportant une co-localisation des protéines CALR mutées avec la calréticuline sauvage et l'autre une absence de colocalisation avec la calnexine) peuvent s'expliquer par la synthèse des protéines au niveau du RE rapidement suivie de leur élimination par l'ERAD. (Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013) Par ailleurs, Chachoua et al. ont pour leur part suggéré la présence des CALR mutantes au niveau d'un compartiment vésiculaire proche du Golgi dont on peut imaginer qu'il s'agisse des vésicules de contrôle qualité. (Benyair et al., 2015a; Chachoua et al., 2016)

La calréticuline présente un site de glycosylation unique en position 327 sur la protéine mature (et donc également présent dans les protéines mutées). Cependant, la

glycosylation effective de la protéine ne semble être observée que dans des conditions de stress (Rizvi et al., 2004). Cette absence de glycosylation en condition basale est donc cohérente avec l'inefficacité des inhibiteurs de glucosidase et du siARN anti-glucosidase II à favoriser l'expression des protéines CALR mutantes. Notre crible moléculaire nous a cependant permis de mettre en évidence le rôle clé d'EDEM3 dans la dégradation des protéines mutantes, sans implication évidente des autres membres de cette famille. Un effet différentiel des différents membres de la famille EDEM sur la dégradation de substrats de l'ERAD a précédemment été démontré. (Tang et al., 2014b) Par ailleurs l'interaction d'EDEM3 avec des clients non glycosylés est également connue ; son interaction avec les protéines CALR mutées n'est donc pas totalement surprenante. (Sato et al., 2012; Tang et al., 2014b) L'absence d'effet de la kifunensine sur la stabilisation des variants de CALR suggère que l'activité mannosidase d'EDEM3 n'est pas nécessaire à la dégradation de ces substrats, même si des expériences utilisant des formes d'EDEM3 mutées au niveau du site MRH seraient nécessaires pour l'affirmer définitivement. De manière concordante, l'absence d'effet de l'extinction d'EDEM2 (agissant en amont d'EDEM3 dans le processus de démannosylation des substrats de l'ERAD) sur la stabilisation des protéines CALR mutées va dans le sens d'un effet indépendant de l'activité mannosidase.

Bien qu'EDEM3 soit également capable d'interagir avec SEL1L (Saeed et al., 2011; Tang et al., 2014b), l'interaction mise en jeu est bien plus faible que pour les autres membres de la famille EDEM, suggérant qu'EDEM3 agit différemment des deux autres et potentiellement avec d'autres partenaires dont l'identité reste à déterminer. Il est notamment étonnant de voir qu'aucun des acteurs de la machinerie classique de dégradation des protéines luminales solubles du RE (OS-9, XTP3-B, HRD1, p97) ne soit impliqué dans la dégradation des protéines CALR mutées. Notamment, HRD1 semble être la principale ubiquitine-ligase E3 impliquée dans la dégradation des substrats de l'ERAD soluble tandis que p97 (dont l'implication dans la dégradation des variants de CALR semble exclue par l'inefficacité du DBE3 à stabiliser leur expression) présente un rôle central dans la dislocation et la dégradation des substrats solubles ou membranaires, qu'ils soient glycosylés ou non. (Bernasconi et al., 2010) Il est possible qu'une redondance entre ces facteurs et éventuellement d'autres protéines masque leur rôle dans la dégradation des protéines CALR mutantes. D'un autre côté, il a été montré que l'élimination des substrats non glycosylés de l'ERAD faisait intervenir spécifiquement certains facteurs non impliqués dans la dégradation de modèles classiques de l'ERAD. (Okuda-Shimizu and Hendershot, 2007)

L'activation de voies de dégradation est une piste thérapeutique largement explorée dans des pathologies engendrées par des protéines mal conformées. Dans ces modèles, activer pharmacologiquement les voies de dégradation (avec de la rapamycine ou du chlorure de lithium) permet de « nettoyer » les cellules des protéines anormales en stimulant leur élimination par l'autophagie. (Fujita et al., 2007; Houck et al., 2014) L'activation de la dégradation de protéines anormales par le protéasome a également été démontrée comme bénéfique notamment dans des modèles de neuropathies dégénératives. (Lee et al., 2010; Leestemaker et al., 2017) Nous avons tenté une approche comparable en surexprimant EDEM3 dans nos lignées cellulaires, sans observer d'inhibition de la prolifération cellulaire. De manière similaire, « l'activation du protéasome » par un traitement des lignées cellulaires UT-7 avec l'IU1 (Lee et al., 2010) n'a pas permis de freiner la prolifération cellulaire associée aux mutations de CALR (données non montrées). Dans ce dernier cas, nous avons cependant pu mettre en évidence que cette absence d'effet était liée à l'incapacité de la drogue à diminuer les niveaux d'expression des CALR mutées (sur lignée cellulaire HEK293T). Ceci suggère que l'étape finale de la dégradation des variants de CALR n'est pas l'étape limitante. L'impact de la surexpression d'EDEM3 sur les niveaux de protéines CALR mutantes reste à définir. On peut cependant émettre l'hypothèse que l'absence d'effet fonctionnel soit liée à la redondance de fonction d'EDEM3 avec d'autres acteurs de l'ERAD, ou sa nécessaire association avec des partenaires qui restent à identifier.

Toujours dans un but thérapeutique, une deuxième option était au contraire d'interférer avec l'élimination des protéines CALR mutées, l'augmentation de leur expression pouvant s'accompagner d'un surdosage à l'origine d'effets toxiques. Plusieurs arguments semblent en effet indiquer une régulation du niveau d'expression de ces protéines oncogéniques. Le premier est la faible fréquence de patients présentant un statut mutationnel homozygote. Par ailleurs, les expériences d'édition génomique réalisées par Nivarthi et al. basées sur la technologie CRISPR-Cas9 vont également dans ce sens. Lorsque les cellules modifiées ne présentent pas de pression de sélection, une majorité des clones présentent une atteinte (avec le bon décalage du cadre de lecture ou non) de toutes les copies de CALR. Par contre lorsque les cellules éditées sont sélectionnées sur leur capacité à proliférer en absence de cytokine (critère permettant d'orienter vers un rôle dans le développement d'un SMP), 2/3 des clones présentent un mutation avec un décalage du cadre de lecture de 1pb sans atteinte de l'autre allèle sauvage, tandis que seuls 18% des clones présentent un statut mutationnel homozygote/hétérozygote composite pour CALR. (Nivarthi et al., 2016) L'effet de

l'extinction d'EDEM3 sur les niveaux d'expression de CALR mutées dans les UT-7 et les répercussions sur la survie cellulaire et la prolifération restent cependant à déterminer.

Il est maintenant clair que l'activité oncogénique des protéines mutantes CALR s'exprime au travers d'une signalisation aberrante initiée par MPL conduisant à une hyperprolifération spécifique du compartiment mégacaryocytaire. (Chachoua et al., 2016; Marty et al., 2016) Cette activité semble cependant contradictoire avec l'observation des faibles niveaux d'expression que nous avons relevés comme d'autres groupes maintenant. Une hypothèse basée sur les analyses immunohistochimiques démontrant une expression importante mais surtout spécifique des protéines mutées dans les mégacaryocytes matures permettrait néanmoins de réconcilier les deux théories ; une stabilisation des protéines spécifiquement dans les mégacaryocytes pouvait en effet participer à la spécificité d'action des mutations de CALR sur ce compartiment tout en restant compatible avec le phénomène de dégradation que nous avons mis en évidence.

Une première hypothèse était la possible stabilisation des ARNm des formes mutées de CALR comparativement à ceux de la forme sauvage. Pour évaluer ce paramètre, nous avons comparé les charges alléliques CALR déterminées sur ARNm extraits de plaquettes purifiées avec celles mesurées sur ADN de polynucléaires neutrophiles. De manière inattendue, les charges observées sur matériel plaquettaire étaient significativement inférieures à celles observées sur cellules granuleuses, suggérant une possible déstabilisation des ARNm CALR portant la mutation. Si celle-ci était confirmée, cela signifierait que le mécanisme mis en jeu dans ce phénomène est spécifique de la lignée mégacaryocytaire puisque la comparaison des charges alléliques CALR effectuée entre ADN et ARN issus de leucocytes ne montrait pas de différence. Aussi, ces données méritent d'être confirmées chez d'autres patients, et notamment au niveau des mégacaryocytes afin de vérifier s'il n'existe pas une compensation par une hyperproduction des ARNm de la forme mutée.

L'un des facteurs pouvant participer à une éventuelle stabilisation des protéines CALR mutées pouvait par ailleurs être leur « cible oncogénique » elle-même : MPL. La protéine chaperonnée aurait ainsi pu également jouer le rôle de chaperonne. Cependant, nos expériences de co-transfection dans la lignée cellulaire HEK293T suggèrent que l'expression seule de ce récepteur n'est pas suffisante pour augmenter les niveaux d'expression des

variants de CALR. Bien que discordantes avec les résultats d'une autre équipe (Han et al., 2016), ces données sont cohérentes avec l'absence de stabilisation évidente des protéines CALR mutantes dans les lignées hématopoïétiques exprimant MPL (DAMI, TF-1 et UT-7 MPL) comparativement aux K562 qui ne l'expriment pas.

Afin d'appréhender plus globalement les effets de la différenciation mégacaryocytaire sur l'expression des protéines CALR mutées, nous avons utilisé des modèles de lignées cellulaires dont la différenciation vers ce lignage peut être induite par le PMA. Les résultats observés sur DAMI n'indiquent pas d'impact de la différenciation sur le niveau d'expression des CALR mutées. A l'inverse, une augmentation d'expression de ces protéines a été observée dans les K562 « différenciées », mais semble plutôt liée à une stabilisation des ARNm qu'à une stabilisation des protéines. Ceci allant à l'encontre des données de charges alléliques obtenues chez les patients, ce phénomène doit être considéré comme une spécificité de cette lignée, et non représentatif de ce qui se passe dans le développement des SMP associés aux mutations de CALR.

L'utilisation d'un modèle plus proche de la « physiologie » était donc nécessaire pour répondre plus clairement à la question posée. Nous avons donc transduit des cellules souches/progénitrices primaires CD34+ isolées de sang placentaire avant de les différencier vers différents types cellulaires hématopoïétiques. Les résultats de cette expérience n'ont pas permis de mettre en évidence l'expression des protéines mutantes CALR dans la condition « différenciation mégacaryocytaire », alors que celles-ci étaient détectables à plus ou moins faible niveau dans les autres conditions. Plusieurs nuances doivent cependant être apportées. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et mériterait donc d'être confirmée. De plus, l'expression des ARNm n'a pas pu être contrôlée à ce jour, ne permettant pas d'exclure un défaut d'induction des transgènes par la doxycycline dans les conditions où la protéine mutée n'est pas détectée. Néanmoins, la trop grande consommation en termes de cellules CD34+, de milieu et de cytokines est un frein qui ne nous a pas encouragés à renouveler cette expérience.

Collectivement, ces résultats semblent indiquer que la différenciation mégacaryocytaire n'influe pas sur la stabilisation des protéines mutées CALR. Les forts niveaux d'expression observés au niveau des biopsies de moelle des patients seraient donc le résultat d'une plus forte expression de CALR dans les mégacaryocytes matures comme l'ont

suggéré Vannucchi et al. (Vannucchi et al., 2014) Ceci pourrait être lié à la polyploïdie de ces cellules. Une autre possibilité serait une stabilisation des protéines mutées au cours de la différenciation mégacaryocytaire spécifiquement dans des conditions pathologiques. Cette hypothèse pourrait être évaluée en réalisant le même type d'expérience que celle effectuée sur cellules CD34+, mais en partant de cellules de patients présentant l'anomalie moléculaire. Notons que si cette théorie s'avérait exacte, il est peu probable qu'elle soit liée à une mutation d'EDEM3. En effet, à ce jour une seule mutation d'EDEM3 a été identifiée dans les hémopathies et concerne un cas de Leucémie Lymphoïde Chronique (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). Une modulation d'expression d'EDEM3 pourrait cependant participer à ce phénomène, par exemple via l'augmentation de l'expression de microARN tels que miR-379 dont l'une des cibles est EDEM3 (Kato et al., 2016) et dont l'expression est augmentée au cours de MFP. (Norfo et al., 2014)

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons cherché à caractériser divers aspects associés aux mutations de *CALR* d'un point de vue translationnel dans un premier temps, puis d'un point de vue plus fondamental.

La caractérisation fine des patients en termes de charge mutationnelle nécessite une technique de quantification précise, comme l'est la PCR digitale que nous avons développée. Si son intérêt pour le suivi thérapeutique a été illustré dans notre publication, elle permettra également de préciser l'éventuelle corrélation des charges alléliques des mutations de *CALR* avec la présentation clinico-biologique des patients. En effet, cette question s'est probablement heurtée à l'utilisation de méthodes aux performances sub-optimales comme l'analyse de fragments. La particularité (ou l'absence de particularité) des patients présentant de faibles charges mutationnelles pourra également être évaluée avec une plus grande précision grâce à notre méthode de quantification.

Dans une deuxième partie, nous avons montré que l'expression des variants de *CALR* ne compromettait pas l'homéostasie du RE, ni n'impacter la sensibilité à l'apoptose induite par un stress du RE. Nous avons également mis en évidence que les protéines *CALR* mutantes étaient dégradées par la voie ERAD-protéasome. Nous avons précisé l'implication d'EDEM3 dans ce phénomène et recherché les effets de sa sur-expression et de son extinction sur la prolifération cellulaire induite par les protéines *CALR* mutées. La sur-expression d'EDEM3 ne semble pas impacter ce paramètre. Une approche d'extinction d'expression d'EDEM3 avec la technologie CRISPR est actuellement en cours d'évaluation. Le rôle direct d'EDEM3 sur la dégradation des variants de *CALR* reste cependant à démontrer. Il serait également intéressant d'identifier les autres acteurs de cette voie de dégradation : il pourrait s'agir de différentes chaperonnes comme BiP, mais également de foldases (notamment des PDI connues pour interagir avec les membres de la famille EDEM). Quoi qu'il en soit, la dégradation de ces protéines (indépendamment d'EDEM3) constitue pour nous une piste thérapeutique potentielle.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons montré que la différenciation mégacaryocytaire « physiologique » n'a pas d'effet notable sur les niveaux de dégradation des mutants de *CALR*. Un effet différent dans des conditions pathologiques ne peut cependant pas

être exclu, impliquant potentiellement une régulation post-transcriptionnelle des mutants eux-mêmes ou des facteurs participant à leur dégradation. Ces différents éléments apportent un éclairage nouveau et original sur le rôle des mutations de *CALR* dans la physiopathologie des SMP et des pistes thérapeutiques potentielles.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Wahab, O., Pardanani, A., Patel, J., Wadleigh, M., Lasho, T., Heguy, A., Beran, M., Gilliland, D.G., Levine, R.L., and Tefferi, A. (2011a). Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 25, 1200–1202.

Abdel-Wahab, O., Pardanani, A., Rampal, R., Lasho, T.L., Levine, R.L., and Tefferi, A. (2011b). DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 25, 1219–1220.

Akada, H., Yan, D., Zou, H., Fiering, S., Hutchison, R.E., and Mohi, M.G. (2010). Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood* 115, 3589–3597.

An, W., Wan, Y., Guo, Y., Chen, X., Ren, Y., Zhang, J., Chang, L., Wei, W., Zhang, P., and Zhu, X. (2014). CALR mutation screening in pediatric primary myelofibrosis. *Pediatr. Blood Cancer*.

Andrikovics, H., Krahling, T., Balassa, K., Halm, G., Bors, A., Koszarska, M., Batai, A., Dolgos, J., Csomor, J., Egyed, M., et al. (2014). Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica* 99, 1184–1190.

Anelli, L., Zagaria, A., Coccaro, N., Tota, G., Minervini, A., Casieri, P., Impera, L., Minervini, C.F., Brunetti, C., Ricco, A., et al. (2016). Droplet digital PCR assay for quantifying of CALR mutant allelic burden in myeloproliferative neoplasms. *Ann. Hematol.* 95, 1559–1560.

Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H.P. (1999). The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat. Cell Biol.* 1, 330–334.

Araki, M., Yang, Y., Masubuchi, N., Hironaka, Y., Takei, H., Morishita, S., Mizukami, Y., Kan, S., Shirane, S., Edahiro, Y., et al. (2016). Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* 127, 1307–1316.

Aranaz, P., Hurtado, C., Erquiaga, I., Miguélez, I., Ormazábal, C., Cristobal, I., García-Delgado, M., Novo, F.J., and Vizmanos, J.L. (2012). CBL mutations in myeloproliferative neoplasms are also found in the gene's proline-rich domain and in patients with the V617FJAK2. *Haematologica* 97, 1234–1241.

Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391–2405.

Avezov, E., Frenkel, Z., Ehrlich, M., Herscovics, A., and Lederkremer, G.Z. (2008). Endoplasmic reticulum (ER) mannosidase I is compartmentalized and required for N-glycan trimming to Man5-6GlcNAc2 in glycoprotein ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* 19, 216–225.

Badbaran, A., Fehse, B., Christopeit, M., Aranyosy, T., Ayuk, F.A., Wolschke, C., and Kröger, N. (2016). Digital-PCR assay for screening and quantitative monitoring of calreticulin (CALR) type-2 positive patients with myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 51, 872–873.

Balligand, T., Achouri, Y., Pecquet, C., Chachoua, I., Nivarthi, H., Marty, C., Vainchenker, W., Plo, I., Kralovics, R., and Constantinescu, S.N. (2016). Pathologic activation of thrombopoietin receptor and JAK2-STAT5 pathway by frameshift mutants of mouse calreticulin. *Leukemia* 30, 1775–1778.

Barosi, G., Gattoni, E., Guglielmelli, P., Campanelli, R., Facchetti, F., Fisogni, S., Goldberg, J., Marchioli, R., Hoffman, R., Vannucchi, A.M., et al. (2010). Phase I/II study of single-agent bortezomib for the treatment of patients with myelofibrosis. Clinical and biological effects of proteasome inhibition. *Am. J. Hematol.* 85, 616–619.

Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., et al. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054–1061.

Bedard, K., Szabo, E., Michalak, M., and Opas, M. (2005). Cellular Functions of Endoplasmic Reticulum Chaperones Calreticulin, Calnexin, and ERp57. In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 91–121.

Beer, P.A., Campbell, P.J., Scott, L.M., Bench, A.J., Erber, W.N., Bareford, D., Wilkins, B.S., Reilly, J.T., Hasselbalch, H.C., Bowman, R., et al. (2008). MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* *112*, 141–149.

Beer, P.A., Delhommeau, F., LeCouédic, J.-P., Dawson, M.A., Chen, E., Bareford, D., Kusec, R., McMullin, M.F., Harrison, C.N., Vannucchi, A.M., et al. (2010). Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood* *115*, 2891–2900.

Bellanné-Chantelot, C., Chaumarel, I., Labopin, M., Bellanger, F., Barbu, V., De Toma, C., Delhommeau, F., Casadevall, N., Vainchenker, W., Thomas, G., et al. (2006). Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* *108*, 346–352.

Benyair, R., Ogen-Shtern, N., and Lederkremer, G.Z. (2015a). Glycan regulation of ER-associated degradation through compartmentalization. *Semin. Cell Dev. Biol.* *41*, 99–109.

Benyair, R., Ogen-Shtern, N., Mazkereth, N., Shai, B., Ehrlich, M., and Lederkremer, G.Z. (2015b). Mammalian ER mannosidase I resides in quality control vesicles, where it encounters its glycoprotein substrates. *Mol. Biol. Cell* *26*, 172–184.

Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol.* *4*, e423.

Bernasconi, R., Pertel, T., Luban, J., and Molinari, M. (2008). A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal. *J. Biol. Chem.* *283*, 16446–16454.

Bernasconi, R., Galli, C., Calanca, V., Nakajima, T., and Molinari, M. (2010). Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates. *J.* *178*

Cell Biol. 188, 223–235.

Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332.

Besancenot, R., Roos-Weil, D., Tonetti, C., Abdelouahab, H., Lacout, C., Pasquier, F., Willekens, C., Rameau, P., Lecluse, Y., Micol, J.-B., et al. (2014). JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation versus differentiation. *Blood*.

Bhattacharyya, S., Yu, H., Mim, C., and Matouschek, A. (2014). Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 122–133.

Boulais, P.E., and Frenette, P.S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* 125, 2621–2629.

Braakman, I., and Hebert, D.N. (2013). Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a013201.

Brecqueville, M., Cervera, N., Gelsi-Boyer, V., Murati, A., Adélaïde, J., Chaffanet, M., Rey, J., Vey, N., Mozziconacci, M.J., and Birnbaum, D. (2011). Rare mutations in DNMT3A in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes. *Blood Cancer J.* 1, e18.

Broséus, J., Lippert, E., Harutyunyan, A.S., Jeromin, S., Zipperer, E., Florensa, L., Milosevic, J.D., Haferlach, T., Germing, U., Luño, E., et al. (2014). Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia*.

Brush, M.H., Weiser, D.C., and Shenolikar, S. (2003). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1292–1303.

Cabagnols, X., Defour, J.P., Ugo, V., Ianotto, J.C., Mossuz, P., Mondet, J., Girodon, F., Alexandre, J.H., Mansier, O., Viallard, J.F., et al. (2014). Differential association of

calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*.

Cabagnols, X., Favale, F., Pasquier, F., Messaoudi, K., Defour, J.P., Ianotto, J.C., Marzac, C., Le Couédic, J.P., Droin, N., Chachoua, I., et al. (2016). Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood* *127*, 333–342.

Caldwell, S.R., Hill, K.J., and Cooper, A.A. (2001). Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J. Biol. Chem.* *276*, 23296–23303.

Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* *415*, 92–96.

Campbell, P.J., and Green, A.R. (2006). The Myeloproliferative Disorders. *N. Engl. J. Med.* *355*, 2452–2466.

Caramelo, J.J., Castro, O.A., Alonso, L.G., De Prat-Gay, G., and Parodi, A.J. (2003). UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 86–91.

Caramelo, J.J., Castro, O.A., de Prat-Gay, G., and Parodi, A.J. (2004). The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates. *J. Biol. Chem.* *279*, 46280–46285.

Carrasco, D.R., Sukhdeo, K., Protopopova, M., Sinha, R., Enos, M., Carrasco, D.E., Zheng, M., Mani, M., Henderson, J., Pinkus, G.S., et al. (2007). The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell* *11*, 349–360.

Cassinat, B., Verger, E., and Kiladjian, J.-J. (2014). Interferon alfa therapy in CALR-mutated essential thrombocythemia. *N. Engl. J. Med.* *371*, 188–189.

Cervantes, F., Passamonti, F., and Barosi, G. (2008). Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 22, 905–914.

Cervantes, F., Dupriez, B., Pereira, A., Passamonti, F., Reilly, J.T., Morra, E., Vannucchi, A.M., Mesa, R.A., Demory, J.-L., Barosi, G., et al. (2009). New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 113, 2895–2901.

Chachoua, I., Pecquet, C., El-Khoury, M., Nivarthi, H., Albu, R.-I., Marty, C., Gryshkova, V., Defour, J.-P., Vertenoil, G., Ngo, A., et al. (2016). Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood* 127, 1325–1335.

Chaligné, R., James, C., Tonetti, C., Besancenot, R., Le Couédic, J.P., Fava, F., Mazurier, F., Godin, I., Maloum, K., Larbret, F., et al. (2007). Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood* 110, 3735–3743.

Chao, M.P., Jaiswal, S., Weissman-Tsukamoto, R., Alizadeh, A.A., Gentles, A.J., Volkmer, J., Weiskopf, K., Willingham, S.B., Raveh, T., Park, C.Y., et al. (2010). Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* 2, 63ra94-63ra94.

Chauveau, A., Ianotto, J.C., Ugo, V., and Lippert, E. (2014). Mutations de la calréticuline dans les syndromes myéloprolifératifs : le chaînon manquant ? 15–19.

Chauveau, A., Nibourel, O., Tondeur, S., Paz, D.L., Mansier, O., Paul, F., Wemeau, M., Preudhomme, C., Lippert, E., Ugo, V., et al. (2017). Absence of CALR mutations in JAK2-negative polycythemia. *Haematologica* 102, e15–e16.

Chen, W., Helenius, J., Braakman, I., and Helenius, A. (1995). Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6229–6233.

Chen, X., Shen, J., and Prywes, R. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J. Biol. Chem.* *277*, 13045–13052.

Chen, Y., Hu, D., Yabe, R., Tateno, H., Qin, S.-Y., Matsumoto, N., Hirabayashi, J., and Yamamoto, K. (2011). Role of malectin in Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-dependent quality control of α 1-antitrypsin. *Mol. Biol. Cell* *22*, 3559–3570.

Chevet, E., Smirle, J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J.M. (2010). Calnexin phosphorylation: linking cytoplasmic signalling to endoplasmic reticulum luminal functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 486–490.

Chevet, E., Hetz, C., and Samali, A. (2015). Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov.* *5*, 586–597.

Chi, J., Manoloukos, M., Pierides, C., Nicolaidou, V., Nicolaou, K., Kleopa, M., Vassiliou, G., and Costeas, P. (2014). Calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms and new methodology for their detection and monitoring. *Ann. Hematol.*

Christianson, J.C., Shaler, T.A., Tyler, R.E., and Kopito, R.R. (2008). OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat. Cell Biol.* *10*, 272–282.

Chung, K.T., Shen, Y., and Hendershot, L.M. (2002). BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J. Biol. Chem.* *277*, 47557–47563.

Cormier, J.H., Tamura, T., Sunryd, J.C., and Hebert, D.N. (2009). EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex. *Mol. Cell* *34*, 627–633.

Cullinan, S.B., and Diehl, J.A. (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* *279*, 20108–20117.

Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., and Diehl, J.A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell Biol.* *23*, 7198–7209.

Daitoku, S., Takenaka, K., Yamauchi, T., Yurino, A., Jinnouchi, F., Nunomura, T., Eto, T., Kamimura, T., Higuchi, M., Harada, N., et al. (2016). Calreticulin mutation does not contribute to disease progression in essential thrombocythemia by inhibiting phagocytosis. *Exp. Hematol.* *44*, 817–825.e3.

Daley, G.Q., Van Etten, R.A., and Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* *247*, 824–830.

DAMESHEK, W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* *6*, 372–375.

Daniels, R., Kurowski, B., Johnson, A.E., and Hebert, D.N. (2003). N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. *Mol. Cell* *11*, 79–90.

Danilczyk, U.G., and Williams, D.B. (2001). The lectin chaperone calnexin utilizes polypeptide-based interactions to associate with many of its substrates in vivo. *J. Biol. Chem.* *276*, 25532–25540.

Delhommeau, F., Pisani, D.F., James, C., Casadevall, N., Constantinescu, S., and Vainchenker, W. (2006). Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *63*, 2939–2953.

Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2289–2301.

Deprez, P., Gautschi, M., and Helenius, A. (2005). More than one glycan is needed for ER glucosidase II to allow entry of glycoproteins into the calnexin/calreticulin cycle. *Mol. Cell* *19*, 183–195.

Dice, J.F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 305–309.

Ding, J., Komatsu, H., Wakita, A., Kato-Uranishi, M., Ito, M., Satoh, A., Tsuboi, K., Nitta, M., Miyazaki, H., Iida, S., et al. (2004). Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* *103*, 4198–4200.

Dobo, I., Donnard, M., Girodon, F., Mossuz, P., Boiret, N., Boukhari, R., Allégraud, A., Bascans, E., Campos, L., Pineau, D., et al. (2004a). Standardization and comparison of endogenous erythroid colony assays performed with bone marrow or blood progenitors for the diagnosis of polycythemia vera. *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc. EHA* *5*, 161–167.

Dobo, I., Boiret, N., Lippert, E., Girodon, F., Mossuz, P., Donnard, M., Campos, L., Pineau, D., Bascans, E., Praloran, V., et al. (2004b). A standardized endogenous megakaryocytic erythroid colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica* *89*, 1207–1212.

Elala, Y.C., Lasho, T.L., Gangat, N., Finke, C., Barraco, D., Haider, M., Abou Hussein, A.K., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A., et al. (2016). Calreticulin variant stratified driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia. *Am. J. Hematol.* *91*, 503–506.

Elf, S., Abdelfattah, N.S., Chen, E., Perales-Patón, J., Rosen, E.A., Ko, A., Peisker, F., Florescu, N., Giannini, S., Wolach, O., et al. (2016). Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discov.* *6*, 368–381.

El-Khoury, M. Les mutants de la Calréticuline induisent l'activation de la voie récepteur de la thrombopoïétine (MPL) / JAK2 (Congrès de la Société Française d'Hématologie 2016).

Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 181–191.

Ellgaard, L., and Ruddock, L.W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* 6, 28–32.

Ellis, R.J., and van der Vies, S.M. (1991). Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 321–347.

Ernst, T., Chase, A.J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C.E., Bryant, C., Jones, A.V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F.M., Reiter, A., et al. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat. Genet.* 42, 722–726.

Frenkel, Z., Gregory, W., Kornfeld, S., and Lederkremer, G.Z. (2003). Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6-5GlcNAc2. *J. Biol. Chem.* 278, 34119–34124.

Frickel, E.-M., Riek, R., Jelesarov, I., Helenius, A., Wuthrich, K., and Ellgaard, L. (2002). TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1954–1959.

Fu, H.Y., Okada, K., Liao, Y., Tsukamoto, O., Isomura, T., Asai, M., Sawada, T., Okuda, K., Asano, Y., Sanada, S., et al. (2010). Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* 122, 361–369.

Fucikova, J., Truxova, I., Hensler, M., Becht, E., Kasikova, L., Moserova, I., Vosahlikova, S., Klouckova, J., Church, S.E., Cremer, I., et al. (2016). Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients. *Blood* 128, 3113–3124.

Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Misutani, A., Matsuda, C., Hayashi, Y.K., and Momoi, T. (2007). Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum. Mol. Genet.* 16, 618–629.

Galli, C., Bernasconi, R., Soldà, T., Calanca, V., and Molinari, M. (2011). Malectin participates in a backup glycoprotein quality control pathway in the mammalian ER. *PloS One* 6, e16304.

Gangat, N., Strand, J., Lasho, T.L., Finke, C.M., Knudson, R.A., Pardanani, A., Li, C.-Y., Ketterling, R.P., and Tefferi, A. (2008). Cytogenetic studies at diagnosis in polycythemia vera: clinical and JAK2V617F allele burden correlates. *Eur. J. Haematol.* 80, 197–200.

Gangat, N., Tefferi, A., Thanarajasingam, G., Patnaik, M., Schwager, S., Ketterling, R., and Wolanskyj, A.P. (2009). Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *Eur. J. Haematol.* 83, 17–21.

Gangat, N., Caramazza, D., Vaidya, R., George, G., Begna, K., Schwager, S., Van Dyke, D., Hanson, C., Wu, W., Pardanani, A., et al. (2011). 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 392–397.

Garbati, M.R., Welgan, C.A., Landefeld, S.H., Newell, L.F., Agarwal, A., Dunlap, J.B., Chourasia, T.K., Lee, H., Elferich, J., Traer, E., et al. (2016). Mutant calreticulin-expressing cells induce monocyte hyperreactivity through a paracrine mechanism. *Am. J. Hematol.* 91, 211–219.

Gelsi-Boyer, V., Brecqueville, M., Devillier, R., Murati, A., Mozziconacci, M.-J., and Birnbaum, D. (2012). Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 5, 12.

Gery, S., Cao, Q., Gueller, S., Xing, H., Tefferi, A., and Koeffler, H.P. (2009). Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J. Leukoc. Biol.* 85, 957–965.

Giona, F., Teofili, L., Capodimonti, S., Laurino, M., Martini, M., Marzella, D., Palumbo, G., Diverio, D., Foà, R., and Larocca, L.M. (2014). CALR mutations in patients with essential thrombocythemia diagnosed in childhood and adolescence. *Blood* 123, 3677–3679.

Gold, L.I., Eggleton, P., Sweetwyne, M.T., Van Duyn, L.B., Greives, M.R., Naylor, S.-M., Michalak, M., and Murphy-Ullrich, J.E. (2010). Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *24*, 665–683.

Gonzalez, D.S., Karaveg, K., Vandersall-Nairn, A.S., Lal, A., and Moremen, K.W. (1999). Identification, expression, and characterization of a cDNA encoding human endoplasmic reticulum mannosidase I, the enzyme that catalyzes the first mannose trimming step in mammalian Asn-linked oligosaccharide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *274*, 21375–21386.

Gotlib, J. (2014). World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2014 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am. J. Hematol.* *89*, 325–337.

Grand, F.H., Hidalgo-Curtis, C.E., Ernst, T., Zoi, K., Zoi, C., McGuire, C., Kreil, S., Jones, A., Score, J., Metzgeroth, G., et al. (2009). Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* *113*, 6182–6192.

Green, A., and Beer, P. (2010). Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* *362*, 369–370.

Green, M.R., Gentles, A.J., Nair, R.V., Irish, J.M., Kihira, S., Liu, C.L., Kela, I., Hopmans, E.S., Myklebust, J.H., Ji, H., et al. (2013). Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood* *121*, 1604–1611.

Groisman, B., Shenkman, M., Ron, E., and Lederkremer, G.Z. (2011). Mannose trimming is required for delivery of a glycoprotein from EDEM1 to XTP3-B and to late endoplasmic reticulum-associated degradation steps. *J. Biol. Chem.* *286*, 1292–1300.

Grozovsky, R., Begonja, A.J., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J.H., Falet, H., and Hoffmeister, K.M. (2015). The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat. Med.* *21*, 47–54.

Guglielmelli, P., Pancrazzi, A., Bergamaschi, G., Rosti, V., Villani, L., Antonioli, E., Bosi, A., Barosi, G., Vannucchi, A.M., GIMEMA--Italian Registry of Myelofibrosis, et al. (2007). Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br. J. Haematol.*

137, 244–247.

Guglielmelli, P., Barosi, G., Pieri, L., Antonioli, E., Bosi, A., and Vannucchi, A.M. (2009). JAK2V617F mutational status and allele burden have little influence on clinical phenotype and prognosis in patients with post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. *Haematologica* 94, 144–146.

Guglielmelli, P., Biamonte, F., Score, J., Hidalgo-Curtis, C., Cervantes, F., Maffioli, M., Fanelli, T., Ernst, T., Winkelman, N., Jones, A.V., et al. (2011). EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood* 118, 5227–5234.

Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Rotunno, G., Score, J., Mannarelli, C., Pancrazzi, A., Biamonte, F., Pardanani, A., Zoi, K., Reiter, A., et al. (2014). The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia*.

Haefliger, S., Klebig, C., Schaubitzer, K., Schardt, J., Timchenko, N., Mueller, B.U., and Pabst, T. (2011). Protein disulfide isomerase blocks CEBPA translation and is up-regulated during the unfolded protein response in AML. *Blood* 117, 5931–5940.

Hammond, C., and Helenius, A. (1994). Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 126, 41–52.

Hampton, R.Y., and Sommer, T. (2012). Finding the will and the way of ERAD substrate retrotranslocation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 460–466.

Han, D., Lerner, A.G., Vande Walle, L., Upton, J.-P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2009). IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 138, 562–575.

Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., et al. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat. Cell Biol.* 15, 481–490.

Han, L., Schubert, C., Köhler, J., Schemionek, M., Isfort, S., Brümmendorf, T.H., Koschmieder, S., and Chatain, N. (2016). Calreticulin-mutant proteins induce megakaryocytic signaling to transform hematopoietic cells and undergo accelerated degradation and Golgi-mediated secretion. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* *9*, 45.

Hanson, S.R., Culyba, E.K., Hsu, T.-L., Wong, C.-H., Kelly, J.W., and Powers, E.T. (2009). The core trisaccharide of an N-linked glycoprotein intrinsically accelerates folding and enhances stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3131–3136.

Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* *397*, 271–274.

Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* *6*, 1099–1108.

Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* *11*, 619–633.

Harutyunyan, A., Klampfl, T., Cazzola, M., and Kralovics, R. (2011). p53 lesions in leukemic transformation. *N. Engl. J. Med.* *364*, 488–490.

Harutyunyan, A.S., Giambruno, R., Krendl, C., Stukalov, A., Klampfl, T., Berg, T., Chen, D., Milosevic Feenstra, J.D., Jäger, R., Gisslinger, B., et al. (2016). Germline RBBP6 mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood* *127*, 362–365.

Haslam, K., and Langabeer, S.E. (2014). Incidence of CALR mutations in patients with splanchnic vein thrombosis. *Br. J. Haematol.*

Haslam, K., Langabeer, S.E., Molloy, K., McMullin, M.F., and Conneally, E. (2014). Assessment of CALR mutations in myelofibrosis patients, post-allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* *166*, 800–802.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* *10*, 3787–3799.

He, R., Hanson, C.A., Chen, D., Oliveira, J.L., Pardnani, A., Reichard, K.K., and Viswanatha, D.S. (2015). Not ALL CALR MUTATIONS ARE CREATED EQUAL. *Leuk. Lymphoma* 1–9.

Hebert, D.N., and Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol. Rev.* *87*, 1377–1408.

Hebert, D.N., Foellmer, B., and Helenius, A. (1995). Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* *81*, 425–433.

Hebert, D.N., Foellmer, B., and Helenius, A. (1996). Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J.* *15*, 2961–2968.

Hebert, D.N., Zhang, J.X., Chen, W., Foellmer, B., and Helenius, A. (1997). The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin. *J. Cell Biol.* *139*, 613–623.

Hegde, R.S., and Bernstein, H.D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 563–571.

Helbling, D. (2005). CFBF-SMMHC is correlated with increased calreticulin expression and suppresses the granulocytic differentiation factor CEBPA in AML with inv(16). *Blood* *106*, 1369–1375.

Helbling, D., Mueller, B.U., Timchenko, N.A., Hagemeyer, A., Jotterand, M., Meyer-Monard, S., Lister, A., Rowley, J.D., Huegli, B., Fey, M.F., et al. (2004). The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EV11 suppresses CEBPA in acute myeloid leukemia by activation of Calreticulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 13312–13317.

Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 1019–1049.

Hermouet, S., Dobo, I., Lippert, E., Boursier, M.-C., Ergand, L., Perrault-Hu, F., and Pineau, D. (2007). Comparison of whole blood vs purified blood granulocytes for the detection and quantitation of JAK2(V617F). *Leukemia* *21*, 1128–1130.

Hetz, C., Chevet, E., and Oakes, S.A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat. Cell Biol.* *17*, 829–838.

Higa, A., Taouji, S., Lhomond, S., Jensen, D., Fernandez-Zapico, M.E., Simpson, J.C., Pasquet, J.-M., Schekman, R., and Chevet, E. (2014). Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6 α requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 1839–1849.

Hirao, K., Natsuka, Y., Tamura, T., Wada, I., Morito, D., Natsuka, S., Romero, P., Sleno, B., Tremblay, L.O., Herscovics, A., et al. (2006). EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J. Biol. Chem.* *281*, 9650–9658.

Hollien, J. (2006). Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science* *313*, 104–107.

Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuri, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A., and Nagata, K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.* *2*, 415–422.

Hosokawa, N., Tremblay, L.O., You, Z., Herscovics, A., Wada, I., and Nagata, K. (2003). Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *J. Biol. Chem.* *278*, 26287–26294.

Hosokawa, N., Wada, I., Natsuka, Y., and Nagata, K. (2006). EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded α 1-antitrypsin. *Genes Cells* *11*, 465–476.

Hosokawa, N., You, Z., Tremblay, L.O., Nagata, K., and Herscovics, A. (2007). Stimulation of ERAD of misfolded null Hong Kong alpha1-antitrypsin by Golgi alpha1,2-mannosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 626–632.

Hosokawa, N., Wada, I., Nagasawa, K., Moriyama, T., Okawa, K., and Nagata, K. (2008). Human XTP3-B forms an endoplasmic reticulum quality control scaffold with the HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex and BiP. *J. Biol. Chem.* 283, 20914–20924.

Hosokawa, N., Kamiya, Y., Kamiya, D., Kato, K., and Nagata, K. (2009). Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *J. Biol. Chem.* 284, 17061–17068.

Hosokawa, N., Tremblay, L.O., Sleno, B., Kamiya, Y., Wada, I., Nagata, K., Kato, K., and Herscovics, A. (2010). EDEM1 accelerates the trimming of alpha1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans. *Glycobiology* 20, 567–575.

Hou, H.-A., Kuo, Y.-Y., Chou, W.-C., Chen, P.-H., and Tien, H.-F. (2014). Calreticulin mutation was rarely detected in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*.

Houck, S.A., Ren, H.Y., Madden, V.J., Bonner, J.N., Conlin, M.P., Janovick, J.A., Conn, P.M., and Cyr, D.M. (2014). Quality control autophagy degrades soluble ERAD-resistant conformers of the misfolded membrane protein GnRHR. *Mol. Cell* 54, 166–179.

Huang, C.-H., Chu, Y.-R., Ye, Y., and Chen, X. (2014). Role of HERP and a HERP-related protein in HRD1-dependent protein degradation at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 289, 4444–4454.

Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O’Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691.

Hultcrantz, M., Kristinsson, S.Y., Andersson, T.M.-L., Landgren, O., Eloranta, S., Derolf, A.R., Dickman, P.W., and Björkholm, M. (2012). Patterns of survival among patients with myeloproliferative neoplasms diagnosed in Sweden from 1973 to 2008: a population-based study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 2995–3001.

Ishida, Y., Yamamoto, A., Kitamura, A., Lamandé, S.R., Yoshimori, T., Bateman, J.F., Kubota, H., and Nagata, K. (2009). Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection. *Mol. Biol. Cell* 20, 2744–2754.

Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2001). Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat. Cell Biol.* 3, 158–164.

Jäger, R., Gisslinger, H., Passamonti, F., Rumi, E., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., Harutyunyan, A., Klampfl, T., Olcaydu, D., et al. (2010). Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 24, 1290–1298.

James, C. (2008). The JAK2V617F mutation in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases? *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 69–75.

James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.-P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., et al. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144–1148.

Jelinek, J., Oki, Y., Gharibyan, V., Bueso-Ramos, C., Prchal, J.T., Verstovsek, S., Beran, M., Estey, E., Kantarjian, H.M., and Issa, J.-P.J. (2005). JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 106, 3370–3373.

Jeromin, S., Kohlmann, A., Meggendorfer, M., Schindela, S., Perglerová, K., Nadarajah, N., Kern, W., Haferlach, C., Haferlach, T., and Schnittger, S. (2016). Next-generation deep-sequencing detects multiple clones of CALR mutations in patients with BCR-ABL1 negative MPN. *Leukemia* 30, 973–976.

Jitsuhara, Y., Toyoda, T., Itai, T., and Yamaguchi, H. (2002). Chaperone-like functions of

high-mannose type and complex-type N-glycans and their molecular basis. *J. Biochem. (Tokyo)* *132*, 803–811.

Jones, A.V., Kreil, S., Zoi, K., Waghorn, K., Curtis, C., Zhang, L., Score, J., Seear, R., Chase, A.J., Grand, F.H., et al. (2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* *106*, 2162–2168.

Jones, A.V., Chase, A., Silver, R.T., Oscier, D., Zoi, K., Wang, Y.L., Cario, H., Pahl, H.L., Collins, A., Reiter, A., et al. (2009). JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* *41*, 446–449.

Jones, A.V., Campbell, P.J., Beer, P.A., Schnittger, S., Vannucchi, A.M., Zoi, K., Percy, M.J., McMullin, M.F., Scott, L.M., Tapper, W., et al. (2010). The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood* *115*, 4517–4523.

Jones, A.V., Ward, D., Lyon, M., Leung, W., Callaway, A., Chase, A., Dent, C.L., White, H.E., Drexler, H.G., Nangalia, J., et al. (2014). Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leuk. Res.*

Kamimoto, T., Shoji, S., Hidvegi, T., Mizushima, N., Umebayashi, K., Perlmutter, D.H., and Yoshimori, T. (2006). Intracellular inclusions containing mutant alpha1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity. *J. Biol. Chem.* *281*, 4467–4476.

Kamiya, Y., Kamiya, D., Yamamoto, K., Nyfeler, B., Hauri, H.-P., and Kato, K. (2008). Molecular basis of sugar recognition by the human L-type lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36. *J. Biol. Chem.* *283*, 1857–1861.

Kanehara, K., Kawaguchi, S., and Ng, D.T.W. (2007). The EDEM and Yos9p families of lectin-like ERAD factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* *18*, 743–750.

Kang, S.-W., Rane, N.S., Kim, S.J., Garrison, J.L., Taunton, J., and Hegde, R.S. (2006). Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell* *127*, 999–1013.

Kato, M., Wang, M., Chen, Z., Bhatt, K., Oh, H.J., Lanting, L., Deshpande, S., Jia, Y., Lai, J.Y.C., O'Connor, C.L., et al. (2016). An endoplasmic reticulum stress-regulated lncRNA hosting a microRNA megacluster induces early features of diabetic nephropathy. *Nat. Commun.* *7*, 12864.

Kaushansky, K. (1998). Thrombopoietin. *N. Engl. J. Med.* *339*, 746–754.

Kaushansky, K. (2005). The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J. Clin. Invest.* *115*, 3339–3347.

Khan, M.M., Nomura, T., Chiba, T., Tanaka, K., Yoshida, H., Mori, K., and Ishii, S. (2004). The Fusion Oncoprotein PML-RAR α Induces Endoplasmic Reticulum (ER)-associated Degradation of N-CoR and ER Stress. *J. Biol. Chem.* *279*, 11814–11824.

Kharabi Masouleh, B., Geng, H., Hurtz, C., Chan, L.N., Logan, A.C., Chang, M.S., Huang, C., Swaminathan, S., Sun, H., Paietta, E., et al. (2014). Mechanistic rationale for targeting the unfolded protein response in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E2219-2228.

Kikkert, M., Doolman, R., Dai, M., Avner, R., Hassink, G., van Voorden, S., Thanedar, S., Roitelman, J., Chau, V., and Wiertz, E. (2004). Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *279*, 3525–3534.

Kiladjian, J.-J., Cervantes, F., Leebeek, F.W.G., Marzac, C., Cassinat, B., Chevret, S., Cazals-Hatem, D., Plessier, A., Garcia-Pagan, J.-C., Darwish Murad, S., et al. (2008a). The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood* *111*, 4922–4929.

Kiladjian, J.-J., Cassinat, B., Chevret, S., Turlure, P., Cambier, N., Roussel, M., Bellucci, S., Grandchamp, B., Chomienne, C., and Fenaux, P. (2008b). Pegylated interferon- α -2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood* *112*, 3065–3072.

Kilpivaara, O., Mukherjee, S., Schram, A.M., Wadleigh, M., Mullally, A., Ebert, B.L., Bass, A., Marubayashi, S., Heguy, A., Garcia-Manero, G., et al. (2009). A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* *41*, 455–459.

Kincaid, M.M., and Cooper, A.A. (2007). Misfolded proteins traffic from the endoplasmic reticulum (ER) due to ER export signals. *Mol. Biol. Cell* *18*, 455–463.

Kitzmüller, C., Caprini, A., Moore, S.E.H., Frénoy, J.-P., Schwaiger, E., Kellermann, O., Ivessa, N.E., and Ermonval, M. (2003). Processing of N-linked glycans during endoplasmic-reticulum-associated degradation of a short-lived variant of ribophorin I. *Biochem. J.* *376*, 687–696.

Kjær, L., Cordua, S., Holmström, M.O., Thomassen, M., Kruse, T.A., Pallisgaard, N., Larsen, T.S., de Stricker, K., Skov, V., and Hasselbalch, H.C. (2016). Differential Dynamics of CALR Mutant Allele Burden in Myeloproliferative Neoplasms during Interferon Alfa Treatment. *PloS One* *11*, e0165336.

Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A.S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., et al. (2013). Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* *369*, 2379–2390.

Kollmann, K., Nangalia, J., Warsch, W., Quentmeier, H., Bench, A., Boyd, E., Scott, M., Drexler, H.G., and Green, A.R. (2014). MARIMO cells harbor a CALR mutation but are not dependent on JAK2/STAT5 signaling. *Leukemia*.

Kollmann, K., Warsch, W., Gonzalez-Arias, C., Nice, F.L., Avezov, E., Milburn, J., Li, J., Dimitropoulou, D., Biddie, S., Wang, M., et al. (2017). A novel signalling screen demonstrates that CALR mutations activate essential MAPK signalling and facilitate megakaryocyte differentiation. *Leukemia* *31*, 934–944.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* *441*, 880–884.

Kondratyev, M., Avezov, E., Shenkman, M., Groisman, B., and Lederkremer, G.Z. (2007). PERK-dependent compartmentalization of ERAD and unfolded protein response machineries during ER stress. *Exp. Cell Res.* *313*, 3395–3407.

Kosmaoglou, M., Kanuga, N., Aguilà, M., Garriga, P., and Cheetham, M.E. (2009). A dual role for EDEM1 in the processing of rod opsin. *J. Cell Sci.* *122*, 4465–4472.

Kouroupi, E., Zoi, K., Parquet, N., Zoi, C., Kiladjian, J.-J., Grigoraki, V., Vainchenker, W., Lellouche, F., Marzac, C., Schlageter, M.-H., et al. (2008). Mutations in exon 12 of JAK2 are mainly found in JAK2 V617F-negative polycythaemia vera patients. *Br. J. Haematol.* *142*, 676–679.

Kozlov, G., Bastos-Aristizabal, S., Määttänen, P., Rosenauer, A., Zheng, F., Killikelly, A., Trempe, J.-F., Thomas, D.Y., and Gehring, K. (2010). Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain. *J. Biol. Chem.* *285*, 35551–35557.

Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.-S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., and Skoda, R.C. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* *352*, 1779–1790.

Kröger, N., Alchalby, H., Klyuchnikov, E., Badbaran, A., Hildebrandt, Y., Ayuk, F., Bacher, U., Bock, O., Kvasnicka, M., Fehse, B., et al. (2009). JAK2-V617F-triggered preemptive and salvage adoptive immunotherapy with donor-lymphocyte infusion in patients with myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* *113*, 1866–1868.

Kruse, K.B., Brodsky, J.L., and McCracken, A.A. (2006). Characterization of an ERAD gene as VPS30/ATG6 reveals two alternative and functionally distinct protein quality control pathways: one for soluble Z variant of human alpha-1 proteinase inhibitor (A1PiZ) and another for aggregates of A1PiZ. *Mol. Biol. Cell* *17*, 203–212.

Krysov, S., Steele, A.J., Coelho, V., Linley, A., Sanchez Hidalgo, M., Carter, M., Potter, K.N., Kennedy, B., Duncombe, A.S., Ashton-Key, M., et al. (2014). Stimulation of surface IgM of chronic lymphocytic leukemia cells induces an unfolded protein response dependent on BTK and SYK. *Blood* *124*, 3101–3109.

Kusio-Kobialka, M., Podszywalow-Bartnicka, P., Peidis, P., Glodkowska-Mrowka, E., Wolanin, K., Leszak, G., Seferynska, I., Stoklosa, T., Koromilas, A.E., and Piwocka, K. (2012). The PERK-eIF2 α phosphorylation arm is a pro-survival pathway of BCR-ABL signaling and confers resistance to imatinib treatment in chronic myeloid leukemia cells. *Cell Cycle* 11, 4069–4078.

Lamriben, L., Graham, J.B., Adams, B.M., and Hebert, D.N. (2016). N-Glycan-based ER Molecular Chaperone and Protein Quality Control System: The Calnexin Binding Cycle. *Traffic Cph. Den.* 17, 308–326.

Langabeer, S.E., Haslam, K., and McMahon, C. (2014). CALR mutations are rare in childhood essential thrombocythemia. *Pediatr. Blood Cancer* 61, 1523.

Lange, T., Edelmann, A., Siebolts, U., Krahl, R., Nehring, C., Jäkel, N., Cross, M., Maier, J., Niederwieser, D., and Wickenhauser, C. (2013). JAK2 p.V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms one month after allogeneic stem cell transplantation significantly predicts outcome and risk of relapse. *Haematologica* 98, 722–728.

Larsen, T.S., Pallisgaard, N., Møller, M.B., and Hasselbalch, H.C. (2007). The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype. *Eur. J. Haematol.* 79, 508–515.

Lasho, T.L., Pardanani, A., and Tefferi, A. (2010). LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 363, 1189–1190.

Lasho, T.L., Finke, C.M., Hanson, C.A., Jimma, T., Knudson, R.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A., and Tefferi, A. (2012b). SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients. *Leukemia* 26, 1135–1137.

Lasho, T.L., Jimma, T., Finke, C.M., Patnaik, M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A., and Tefferi, A. (2012a). SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood* 120, 4168–4171.

Lasho, T.L., Elliott, M.A., Pardanani, A., and Tefferi, A. (2014). CALR mutation studies in chronic neutrophilic leukemia. *Am. J. Hematol.* 89, 450.

Lau, W.W.Y., Hannah, R., Green, A.R., and Göttgens, B. (2015). The JAK-STAT signaling pathway is differentially activated in CALR-positive compared with JAK2V617F-positive ET patients. *Blood* 125, 1679–1681.

Lee, B.-H., Lee, M.J., Park, S., Oh, D.-C., Elsasser, S., Chen, P.-C., Gartner, C., Dimova, N., Hanna, J., Gygi, S.P., et al. (2010). Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* 467, 179–184.

Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 16, 452–466.

Leestemaker, Y., de Jong, A., Witting, K.F., Penning, R., Schuurman, K., Rodenko, B., Zaal, E.A., van de Kooij, B., Laufer, S., Heck, A.J.R., et al. (2017). Proteasome Activation by Small Molecules. *Cell Chem. Biol.* 24, 725–736.e7.

Leitman, J., Shenkman, M., Gofman, Y., Shtern, N.O., Ben-Tal, N., Hendershot, L.M., and Lederkremer, G.Z. (2014). Herp coordinates compartmentalization and recruitment of HRD1 and misfolded proteins for ERAD. *Mol. Biol. Cell* 25, 1050–1060.

Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J.P., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., et al. (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387–397.

Lilley, B.N., and Ploegh, H.L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834–840.

Lilley, B.N., and Ploegh, H.L. (2005). Multiprotein complexes that link dislocation,

ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14296–14301.

Lim, K.-H., Chang, Y.-C., Gon-Shen Chen, C., Lin, H.-C., Wang, W.-T., Chiang, Y.-H., Cheng, H.-I., Su, N.-W., Lin, J., Chang, Y.-F., et al. (2015). Frequent CALR exon 9 alterations in JAK2 V617F-mutated essential thrombocythemia detected by high-resolution melting analysis. *Blood Cancer J.* *5*, e295.

Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* *318*, 944–949.

Lippert, E., Boissinot, M., Kralovics, R., Girodon, F., Dobo, I., Praloran, V., Boiret-Dupré, N., Skoda, R.C., and Hermouet, S. (2006). The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* *108*, 1865–1867.

Liu, C.Y., Wong, H.N., Schauerte, J.A., and Kaufman, R.J. (2002). The protein kinase/endoribonuclease IRE1 α that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain. *J. Biol. Chem.* *277*, 18346–18356.

Liu, K., Martini, M., Rocca, B., Amos, C.I., Teofili, L., Giona, F., Ding, J., Komatsu, H., Larocca, L.M., and Skoda, R.C. (2009). Evidence for a founder effect of the MPL-S505N mutation in eight Italian pedigrees with hereditary thrombocythemia. *Haematologica* *94*, 1368–1374.

Lopez, J.J., Palazzo, A., Chaabane, C., Albarran, L., Polidano, E., Lebozec, K., Dally, S., Nurden, P., Enouf, J., Debili, N., et al. (2013). Crucial Role for Endoplasmic Reticulum Stress During Megakaryocyte Maturation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 2750–2758.

Lu, M., Lawrence, D.A., Marsters, S., Acosta-Alvear, D., Kimmig, P., Mendez, A.S., Paton, A.W., Paton, J.C., Walter, P., and Ashkenazi, A. (2014). Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science* *345*, 98–101.

Lundberg, P., Nienhold, R., Ambrosetti, A., Cervantes, F., Pérez-Encinas, M.M., and Skoda, R.C. (2014). Somatic mutations in calreticulin can be found in pedigrees with familial predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Blood* *123*, 2744–2745.

Luo, B., and Lee, A.S. (2012). The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene* *32*, 805–818.

Lykke-Andersen, S., and Jensen, T.H. (2015). Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 665–677.

Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2004a). The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat. Rev. Cancer* *4*, 966–977.

Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2004b). Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. *J. Biol. Chem.* *279*, 13792–13799.

Machlus, K.R., and Italiano, J.E. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J. Cell Biol.* *201*, 785–796.

Maestre, L., Tooze, R., Cañamero, M., Montes-Moreno, S., Ramos, R., Doody, G., Boll, M., Barrans, S., Baena, S., Piris, M.A., et al. (2009). Expression pattern of XBP1(S) in human B-cell lymphomas. *Haematologica* *94*, 419–422.

Maffioli, M., Genoni, A., Caramazza, D., Mora, B., Bussini, A., Merli, M., Giorgino, T., Casalone, R., and Passamonti, F. (2014). Looking for CALR mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* *28*, 1357–1360.

Mancini, R., Aebi, M., and Helenius, A. (2003). Multiple endoplasmic reticulum-associated pathways degrade mutant yeast carboxypeptidase Y in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 46895–46905.

Manié, S.N., Lebeau, J., and Chevet, E. (2014). Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein

response in oncogenesis: an update. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *307*, C901-907.

Mansier, O., Migeon, M., Saint-Lézer, A., James, C., Verger, E., Robin, M., Socié, G., Bidet, A., Mahon, F.-X., Cassinat, B., et al. (2016). Quantification of the Mutant CALR Allelic Burden by Digital PCR: Application to Minimal Residual Disease Evaluation after Bone Marrow Transplantation. *J. Mol. Diagn.* *18*, 68–74.

Marada, S., Stewart, D.P., Bodeen, W.J., Han, Y.-G., and Ogden, S.K. (2013). The unfolded protein response selectively targets active smoothed mutants. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 2375–2387.

Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* *18*, 3066–3077.

Marin, M.B., Ghenea, S., Spiridon, L.N., Chiritoiu, G.N., Petrescu, A.-J., and Petrescu, S.-M. (2012). Tyrosinase degradation is prevented when EDEM1 lacks the intrinsically disordered region. *PloS One* *7*, e42998.

Marty, C., Pecquet, C., Nivarthi, H., El-Khoury, M., Chachoua, I., Tulliez, M., Villeval, J.-L., Raslova, H., Kralovics, R., Constantinescu, S.N., et al. (2016). Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* *127*, 1317–1324.

Mast, S.W., Diekman, K., Karaveg, K., Davis, A., Sifers, R.N., and Moremen, K.W. (2005). Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins. *Glycobiology* *15*, 421–436.

McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1249–1259.

Mehnert, M., Sommer, T., and Jarosch, E. (2010). ERAD ubiquitin ligases: multifunctional tools for protein quality control and waste disposal in the endoplasmic reticulum. *BioEssays* *202*

News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. 32, 905–913.

Mesa, R.A., Verstovsek, S., Rivera, C., Pardanani, A., Hussein, K., Lasho, T., Wu, W., and Tefferi, A. (2008). Bortezomib therapy in myelofibrosis: a phase II clinical trial. *Leukemia* 22, 1636–1638.

Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., and Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 417, 651.

Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682.

Milosevic Feenstra, J.D., Nivarthi, H., Gisslinger, H., Leroy, E., Rumi, E., Chachoua, I., Bagienski, K., Kubsova, B., Pietra, D., Gisslinger, B., et al. (2016). Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 127, 325–332.

Mimura, N., Fulciniti, M., Gorgun, G., Tai, Y.-T., Cirstea, D., Santo, L., Hu, Y., Fabre, C., Minami, J., Ohguchi, H., et al. (2012). Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood* 119, 5772–5781.

Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P., and Paganetti, P. (2003). Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 299, 1397–1400.

Molinari, M., Eriksson, K.K., Calanca, V., Galli, C., Cresswell, P., Michalak, M., and Helenius, A. (2004). Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control. *Mol. Cell* 13, 125–135.

Mossuz, P., Girodon, F., Donnard, M., Latger-Cannard, V., Dobo, I., Boiret, N., Lecron, J.C., Binguet, C., Barro, C., Hermouet, S., et al. (2004). Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica* 89, 1194–1198.

Mueller, B., Klemm, E.J., Spooner, E., Claessen, J.H., and Ploegh, H.L. (2008). SEL1L

nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 12325–12330.

Nangalia, J., Massie, C.E., Baxter, E.J., Nice, F.L., Gundem, G., Wedge, D.C., Avezov, E., Li, J., Kollmann, K., Kent, D.G., et al. (2013). Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* *369*, 2391–2405.

Nichols, W.C., Seligsohn, U., Zivelin, A., Terry, V.H., Hertel, C.E., Wheatley, M.A., Moussalli, M.J., Hauri, H.P., Ciavarella, N., Kaufman, R.J., et al. (1998). Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell* *93*, 61–70.

Nilsson, I.M., and von Heijne, G. (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* *268*, 5798–5801.

Ninagawa, S., Okada, T., Sumitomo, Y., Kamiya, Y., Kato, K., Horimoto, S., Ishikawa, T., Takeda, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., et al. (2014). EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step. *J. Cell Biol.* *206*, 347–356.

Ninagawa, S., Okada, T., Sumitomo, Y., Horimoto, S., Sugimoto, T., Ishikawa, T., Takeda, S., Yamamoto, T., Suzuki, T., Kamiya, Y., et al. (2015). Forcible destruction of severely misfolded mammalian glycoproteins by the non-glycoprotein ERAD pathway. *J. Cell Biol.* *211*, 775–784.

Nivarthi, H., Chen, D., Cleary, C., Kubesova, B., Jäger, R., Bogner, E., Marty, C., Pecquet, C., Vainchenker, W., Constantinescu, S.N., et al. (2016). Thrombopoietin receptor is required for the oncogenic function of CALR mutants. *Leukemia* *30*, 1759–1763.

Norfo, R., Zini, R., Pennucci, V., Bianchi, E., Salati, S., Guglielmelli, P., Bogani, C., Fanelli, T., Mannarelli, C., Rosti, V., et al. (2014). miRNA-mRNA integrative analysis in primary myelofibrosis CD34+ cells: role of miR-155/JARID2 axis in abnormal megakaryopoiesis. *Blood* *124*, e21-32.

Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J. Cell Biol.* *153*, 1011–1022.

Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* *25*, 85–109.

Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J., Lee, K.P., and Boise, L.H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* *107*, 4907–4916.

Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I., and Nagata, K. (2003). EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* *299*, 1394–1397.

Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R.J., Nagata, K., and Mori, K. (2006). Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J. Cell Biol.* *172*, 383–393.

Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M., and Mori, K. (2002). Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* *366*, 585–594.

Okuda-Shimizu, Y., and Hendershot, L.M. (2007). Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Mol. Cell* *28*, 544–554.

Olcaydu, D., Harutyunyan, A., Jäger, R., Berg, T., Gisslinger, B., Pabinger, I., Gisslinger, H., and Kralovics, R. (2009a). A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* *41*, 450–454.

Olcaydu, D., Skoda, R.C., Looser, R., Li, S., Cazzola, M., Pietra, D., Passamonti, F., Lippert, E., Carillo, S., Girodon, F., et al. (2009b). The “GGCC” haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. *Leukemia* *23*, 1924–

Olivari, S., and Molinari, M. (2007). Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins. *FEBS Lett.* *581*, 3658–3664.

Olivari, S., Galli, C., Alanen, H., Ruddock, L., and Molinari, M. (2005). A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J. Biol. Chem.* *280*, 2424–2428.

Olivari, S., Cali, T., Salo, K.E.H., Paganetti, P., Ruddock, L.W., and Molinari, M. (2006). EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *349*, 1278–1284.

Oliver, J.D., van der Wal, F.J., Bulleid, N.J., and High, S. (1997). Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* *275*, 86–88.

Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H., and High, S. (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol. Biol. Cell* *10*, 2573–2582.

Orenstein, S.J., and Cuervo, A.M. (2010). Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 719–726.

Otero, J.H., Lizák, B., and Hendershot, L.M. (2010). Life and death of a BiP substrate. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 472–478.

Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, E.A., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H.P., Goodman, A.G., Harant, H., Garrison, J.L., et al. (2006). Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* *126*, 727–739.

Pan, S., Wang, S., Utama, B., Huang, L., Blok, N., Estes, M.K., Moremen, K.W., and Sifers, R.N. (2011). Golgi localization of ERManI defines spatial separation of the mammalian glycoprotein quality control system. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2810–2822.

Pan, S., Cheng, X., and Sifers, R.N. (2013). Golgi-situated endoplasmic reticulum α -1, 2-mannosidase contributes to the retrieval of ERAD substrates through a direct interaction with γ -COP. *Mol. Biol. Cell* 24, 1111–1121.

Panagiota, V., Thol, F., Markus, B., Fehse, B., Alchalby, H., Badbaran, A., Lehmann, U., Koenecke, C., Shahswar, R., Chaturvedi, A., et al. (2014). Prognostic effect of calreticulin mutations in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*.

Pang, W.W., Pluvineau, J.V., Price, E.A., Sridhar, K., Arber, D.A., Greenberg, P.L., Schrier, S.L., Park, C.Y., and Weissman, I.L. (2013). Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3011–3016.

Papandreou, I., Denko, N.C., Olson, M., Van Melckebeke, H., Lust, S., Tam, A., Solow-Cordero, D.E., Bouley, D.M., Offner, F., Niwa, M., et al. (2011). Identification of an Irelalpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood* 117, 1311–1314.

Pardanani, A., Lasho, T.L., Finke, C., Mesa, R.A., Hogan, W.J., Ketterling, R.P., Gilliland, D.G., and Tefferi, A. (2007). Extending Jak2V617F and MplW515 mutation analysis to single hematopoietic colonies and B and T lymphocytes. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2358–2362.

Pardanani, A., Lasho, T.L., Finke, C.M., Mai, M., McClure, R.F., and Tefferi, A. (2010a). IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 24, 1146–1151.

Pardanani, A., Lasho, T., Finke, C., Oh, S.T., Gotlib, J., and Tefferi, A. (2010b). LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia* 24, 1713–1718.

Pardanani, A.D., Levine, R.L., Lasho, T., Pikman, Y., Mesa, R.A., Wadleigh, M., Steensma, D.P., Elliott, M.A., Wolanskyj, A.P., Hogan, W.J., et al. (2006). MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 108, 3472–3476.

Park, E., and Rapoport, T.A. (2012). Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu. Rev. Biophys.* *41*, 21–40.

Parzych, K.R., and Klionsky, D.J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 460–473.

Passamonti, F., Rumi, E., Pungolino, E., Malabarba, L., Bertazzoni, P., Valentini, M., Orlandi, E., Arcaini, L., Brusamolino, E., Pascutto, C., et al. (2004). Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am. J. Med.* *117*, 755–761.

Passamonti, F., Rumi, E., Pietra, D., Elena, C., Boveri, E., Arcaini, L., Roncoroni, E., Astori, C., Merli, M., Boggi, S., et al. (2010). A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia* *24*, 1574–1579.

Passamonti, F., Elena, C., Schnittger, S., Skoda, R.C., Green, A.R., Girodon, F., Kiladjian, J.-J., McMullin, M.F., Ruggeri, M., Besses, C., et al. (2011). Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* *117*, 2813–2816.

Patnaik, M.M., Belachew, A., Finke, C., Lasho, T.L., Hanson, C.A., and Tefferi, A. (2014). CALR mutations are infrequent in WHO-defined refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia* *28*, 1370–1371.

Pearse, B.R., Gabriel, L., Wang, N., and Hebert, D.N. (2008). A cell-based reglucosylation assay demonstrates the role of GT1 in the quality control of a maturing glycoprotein. *J. Cell Biol.* *181*, 309–320.

Percy, M.J., Scott, L.M., Erber, W.N., Harrison, C.N., Reilly, J.T., Jones, F.G.C., Green, A.R., and McMullin, M.F. (2007). The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* *92*, 1607–1614.

Peterson, J.R., Ora, A., Van, P.N., and Helenius, A. (1995). Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Mol. Biol. Cell* 6, 1173–1184.

Pietra, D., Li, S., Brisci, A., Passamonti, F., Rumi, E., Theocharides, A., Ferrari, M., Gisslinger, H., Kralovics, R., Cremonesi, L., et al. (2008). Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 111, 1686–1689.

Pietra, D., Rumi, E., Ferretti, V.V., Di Buduo, C.A., Milanesi, C., Cavalloni, C., Sant'Antonio, E., Abbonante, V., Moccia, F., Casetti, I.C., et al. (2016). Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 30, 431–438.

Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., et al. (2006). MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* 3, e270.

Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337–1349.

Pytel, D., Majsterek, I., and Diehl, J.A. (2016). Tumor progression and the different faces of the PERK kinase. *Oncogene* 35, 1207–1215.

Rajagopalan, S., Xu, Y., and Brenner, M.B. (1994). Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science* 263, 387–390.

Rampal, R., Al-Shahrour, F., Abdel-Wahab, O., Patel, J., Brunel, J.-P., Mermel, C.H., Bass, A.J., Pretz, J., Ahn, J., Hricik, T., et al. (2014). Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*.

Reid, D.W., Chen, Q., Tay, A.S.-L., Shenolikar, S., and Nicchitta, C.V. (2014). The unfolded

protein response triggers selective mRNA release from the endoplasmic reticulum. *Cell* 158, 1362–1374.

Renneville, A., Quesnel, B., Charpentier, A., Terriou, L., Crinquette, A., Lai, J.-L., Cossement, C., Lionne-Huyghe, P., Rose, C., Bauters, F., et al. (2006). High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia* 20, 2067–2070.

Ritter, C., Quirin, K., Kowarik, M., and Helenius, A. (2005). Minor folding defects trigger local modification of glycoproteins by the ER folding sensor GT. *EMBO J.* 24, 1730–1738.

Rizvi, S.M., Mancino, L., Thammavongsa, V., Cantley, R.L., and Raghavan, M. (2004). A polypeptide binding conformation of calreticulin is induced by heat shock, calcium depletion, or by deletion of the C-terminal acidic region. *Mol. Cell* 15, 913–923.

Robb, L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26, 6715–6723.

Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529.

Ron, E., Shenkman, M., Groisman, B., Izenshtein, Y., Leitman, J., and Lederkremer, G.Z. (2011). Bypass of glycan-dependent glycoprotein delivery to ERAD by up-regulated EDEM1. *Mol. Biol. Cell* 22, 3945–3954.

Rosati, E., Sabatini, R., Rampino, G., De Falco, F., Di Ianni, M., Falzetti, F., Fettucciari, K., Bartoli, A., Screpanti, I., and Marconi, P. (2010). Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in B-CLL. *Blood* 116, 2713–2723.

Rotunno, G., Mannarelli, C., Guglielmelli, P., Pacilli, A., Pancrazzi, A., Pieri, L., Fanelli, T., Bosi, A., and Vannucchi, A. (2013). Impact of Calreticulin Mutations on Clinical and Hematological Phenotype and Outcome in Essential Thrombocythemia. *Blood*.

Rowley, J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic 210

myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290–293.

Ruiz-Canada, C., Kelleher, D.J., and Gilmore, R. (2009). Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell* 136, 272–283.

Rumi, E., Pietra, D., Ferretti, V., Klampfl, T., Harutyunyan, A.S., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Elena, C., Casetti, I.C., et al. (2013). JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*.

Rumi, E., Harutyunyan, A.S., Pietra, D., Milosevic, J.D., Casetti, I.C., Bellini, M., Them, N.C.C., Cavalloni, C., Ferretti, V.V., Milanese, C., et al. (2014a). CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood* 123, 2416–2419.

Rumi, E., Pietra, D., Pascutto, C., Guglielmelli, P., Martínez-Trillos, A., Casetti, I., Colomer, D., Pieri, L., Pratcorona, M., Rotunno, G., et al. (2014b). Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 124, 1062–1069.

Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi Akha, A.A., Raden, D., and Kaufman, R.J. (2006). Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* 4, e374.

Saeed, M., Suzuki, R., Watanabe, N., Masaki, T., Tomonaga, M., Muhammad, A., Kato, T., Matsuura, Y., Watanabe, H., Wakita, T., et al. (2011). Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J. Biol. Chem.* 286, 37264–37273.

Saharinen, P., and Silvennoinen, O. (2002). 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.* 277, 47954–47963.

Saito, Y., Ihara, Y., Leach, M.R., Cohen-Doyle, M.F., and Williams, D.B. (1999). Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *EMBO J.* *18*, 6718–6729.

Saliba, J., Saint-Martin, C., Di Stefano, A., Lenglet, G., Marty, C., Keren, B., Pasquier, F., Valle, V.D., Secardin, L., Leroy, G., et al. (2015). Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nat. Genet.* *47*, 1131–1140.

Sato, T., Sako, Y., Sho, M., Momohara, M., Suico, M.A., Shuto, T., Nishitoh, H., Okiyoneda, T., Kokame, K., Kaneko, M., et al. (2012). STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. *Mol. Cell* *47*, 99–110.

Satoh, T., Suzuki, K., Yamaguchi, T., and Kato, K. (2014). Structural basis for disparate sugar-binding specificities in the homologous cargo receptors ERGIC-53 and VIP36. *PLoS One* *9*, e87963.

Savage, D.G., Szydlo, R.M., and Goldman, J.M. (1997). Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br. J. Haematol.* *96*, 111–116.

Schallus, T., Jaech, C., Fehér, K., Palma, A.S., Liu, Y., Simpson, J.C., Mackeen, M., Stier, G., Gibson, T.J., Feizi, T., et al. (2008). Malectin: a novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation. *Mol. Biol. Cell* *19*, 3404–3414.

Schardt, J.A., Weber, D., Eyholzer, M., Mueller, B.U., and Pabst, T. (2009). Activation of the Unfolded Protein Response Is Associated with Favorable Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* *15*, 3834–3841.

Schardt, J.A., Eyholzer, M., Timchenko, N.A., Mueller, B.U., and Pabst, T. (2010). Unfolded protein response suppresses CEBPA by induction of calreticulin in acute myeloid leukaemia. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 1509–1519.

Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-212

Weir, S., and Kaufman, R.J. (2001). Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol. Cell* 7, 1165–1176.

Schnittger, S., Bacher, U., Haferlach, C., Beelen, D., Bojko, P., Bürkle, D., Dengler, R., Distelrath, A., Eckart, M., Eckert, R., et al. (2009). Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica* 94, 141–144.

Schnittger, S., Bacher, U., Alpermann, T., Reiter, A., Ulke, M., Dicker, F., Eder, C., Kohlmann, A., Grossmann, V., Kowarsch, A., et al. (2012). Use of CBL exon 8 and 9 mutations in diagnosis of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative disorders: an analysis of 636 cases. *Haematologica* 97, 1890–1894.

Schrag, J.D., Bergeron, J.J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D.Y., and Cygler, M. (2001). The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol. Cell* 8, 633–644.

Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 739–789.

Scott, L.M., Tong, W., Levine, R.L., Scott, M.A., Beer, P.A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Erber, W.N., McMullin, M.F., Harrison, C.N., et al. (2007). JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 356, 459–468.

Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81–93.

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99–111.

Shide, K., Kameda, T., Yamaji, T., Sekine, M., Inada, N., Kamiunten, A., Akizuki, K., Nakamura, K., Hidaka, T., Kubuki, Y., et al. (2016). Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia*.

Słomińska-Wojewódzka, M., and Sandvig, K. (2015). The Role of Lectin-Carbohydrate Interactions in the Regulation of ER-Associated Protein Degradation. *Mol. Basel Switz.* *20*, 9816–9846.

Słomińska-Wojewódzka, M., Gregers, T.F., Wälchli, S., and Sandvig, K. (2006). EDEM is involved in retrotranslocation of ricin from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1664–1675.

Smalberg, J.H., Arends, L.R., Valla, D.C., Kiladjian, J.-J., Janssen, H.L.A., and Leebeek, F.W.G. (2012). Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood* *120*, 4921–4928.

Sokołowska, I., Piłka, E.S., Sandvig, K., Węgrzyn, G., and Słomińska-Wojewódzka, M. (2015). Hydrophobicity of protein determinants influences the recognition of substrates by EDEM1 and EDEM2 in human cells. *BMC Cell Biol.* *16*, 1.

Soldà, T., Galli, C., Kaufman, R.J., and Molinari, M. (2007). Substrate-specific requirements for UGT1-dependent release from calnexin. *Mol. Cell* *27*, 238–249.

Sousa, M., and Parodi, A.J. (1995). The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *EMBO J.* *14*, 4196–4203.

Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J.W. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *167*, 35–41.

Steensma, D.P., Dewald, G.W., Lasho, T.L., Powell, H.L., McClure, R.F., Levine, R.L., Gilliland, D.G., and Tefferi, A. (2005). The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* *106*, 1207–1209.

Steensma, D.P., Caudill, J.S.C., Pardanani, A., McClure, R.F., Lasho, T.L., and Tefferi, A. (2006). MPL W515 and JAK2 V617 mutation analysis in patients with refractory anemia with ringed sideroblasts and an elevated platelet count. *Haematologica* 91, ECR57.

Stegelmann, F., Bullinger, L., Schlenk, R.F., Paschka, P., Griesshammer, M., Blersch, C., Kuhn, S., Schauer, S., Döhner, H., and Döhner, K. (2011). DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 25, 1217–1219.

Stein, B.L., Williams, D.M., O’Keefe, C., Rogers, O., Ingersoll, R.G., Spivak, J.L., Verma, A., Maciejewski, J.P., McDevitt, M.A., and Moliterno, A.R. (2011). Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematologica* 96, 1462–1469.

Stein, H., Bob, R., Dürkop, H., Erck, C., Kämpfe, D., Kvasnicka, H.-M., Martens, H., Roth, A., and Streubel, A. (2015). A new monoclonal antibody (CAL2) detects CALRETICULIN mutations in formalin-fixed and paraffin embedded bone marrow biopsies. *Leukemia*.

Sun, H., Lin, D.-C., Guo, X., Kharabi Masouleh, B., Gery, S., Cao, Q., Alkan, S., Ikezoe, T., Akiba, C., Paquette, R., et al. (2016). Inhibition of IRE1 α -driven pro-survival pathways is a promising therapeutic application in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 7, 18736–18749.

Swerdlow, S.H., International Agency for Research on Cancer, and World Health Organization (2008). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Lyon, France: International Agency for Research on Cancer).

Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 184–190.

Tamura, T., Cormier, J.H., and Hebert, D.N. (2011). Characterization of early EDEM1 protein maturation events and their functional implications. *J. Biol. Chem.* 286, 24906–24915.

Tang, C.-H.A., Ranatunga, S., Kriss, C.L., Cubitt, C.L., Tao, J., Pinilla-Ibarz, J.A., Del Valle,

J.R., and Hu, C.-C.A. (2014a). Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival. *J. Clin. Invest.* *124*, 2585–2598.

Tang, G., Hidalgo Lopez, J.E., Wang, S.A., Hu, S., Ma, J., Pierce, S., Zuo, W., Carballo-Zarate, A.A., Yin, C.C., Tang, Z., et al. (2017). Characteristics and clinical significance of cytogenetic abnormalities in polycythemia vera. *Haematologica* *102*, 1511–1518.

Tang, H.-Y., Huang, C.-H., Zhuang, Y.-H., Christianson, J.C., and Chen, X. (2014b). EDEM2 and OS-9 are required for ER-associated degradation of non-glycosylated sonic hedgehog. *PloS One* *9*, e92164.

Tanimura, A., Yujiri, T., Tanaka, Y., Hatanaka, M., Mitani, N., Nakamura, Y., Mori, K., and Tanizawa, Y. (2009). The anti-apoptotic role of the unfolded protein response in Bcr-Abl-positive leukemia cells. *Leuk. Res.* *33*, 924–928.

Tapper, W., Jones, A.V., Kralovics, R., Harutyunyan, A.S., Zoi, K., Leung, W., Godfrey, A.L., Guglielmelli, P., Callaway, A., Ward, D., et al. (2015). Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Commun.* *6*, 6691.

Tefferi, A., Thiele, J., Orazi, A., Kvasnicka, H.M., Barbui, T., Hanson, C.A., Barosi, G., Verstovsek, S., Birgegard, G., Mesa, R., et al. (2007). 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.

Tefferi, A., Verstovsek, S., and Pardanani, A. (2008). How we diagnose and treat WHO-defined systemic mastocytosis in adults. *Haematologica* *93*, 6–9.

Tefferi, A., Skoda, R., and Vardiman, J.W. (2009a). Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *6*, 627–637.

Tefferi, A., Pardanani, A., Lim, K.-H., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Patel, J., Gangat, N., Finke, C.M., Schwager, S., Mullally, A., et al. (2009b). TET2 mutations and their clinical

correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 23, 905–911.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Abdel-Wahab, O., Guglielmelli, P., Patel, J., Caramazza, D., Pieri, L., Finke, C.M., Kilpivaara, O., Wadleigh, M., et al. (2010). IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* 24, 1302–1309.

Tefferi, A., Guglielmelli, P., Larson, D.R., Finke, C., Wassie, E.A., Pieri, L., Gangat, N., Fjerza, R., Belachew, A.A., Lasho, T.L., et al. (2014e). Long-term survival and blast transformation in molecularly-annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *Blood*.

Tefferi, A., Finke, C.M., Lasho, T.L., Wassie, E.A., Knudson, R., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., and Pardanani, A. (2014a). U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are strongly associated with anemia and thrombocytopenia despite clustering with JAK2V617F and normal karyotype. *Leukemia* 28, 431–433.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C.M., Knudson, R.A., Ketterling, R., Hanson, C.H., Maffioli, M., Caramazza, D., Passamonti, F., and Pardanani, A. (2014b). CALR vs JAK2 vs MPL mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*.

Tefferi, A., Wassie, E.A., Lasho, T.L., Finke, C., Belachew, A.A., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., Pardanani, A., Gangat, N., and Wolanskyj, A.P. (2014c). Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia*.

Tefferi, A., Wassie, E.A., Guglielmelli, P., Gangat, N., Belachew, A.A., Lasho, T.L., Finke, C., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., Pardanani, A., et al. (2014d). Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am. J. Hematol.* 89, E121-124.

Tefferi, A., Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Rotunno, G., Finke, C., Mannarelli, C., Belachew, A.A., Pancrazzi, A., Wassie, E.A., Ketterling, R.P., et al. (2014f). CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of

570 patients. *Leukemia* 28, 1494–1500.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C., Belachew, A.A., Wassie, E.A., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., and Pardanani, A. (2014g). Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* 28, 1568–1570.

Termine, D.J., Moremen, K.W., and Sifers, R.N. (2009). The mammalian UPR boosts glycoprotein ERAD by suppressing the proteolytic downregulation of ER mannosidase I. *J. Cell Sci.* 122, 976–984.

Thiele, J. (2009). Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 132, 261–280.

Thiele, J., and Kvasnicka, H.M. (2006). A critical reappraisal of the WHO classification of the chronic myeloproliferative disorders. *Leuk. Lymphoma* 47, 381–396.

Tiedt, R., Hao-Shen, H., Sobas, M.A., Looser, R., Dirnhofer, S., Schwaller, J., and Skoda, R.C. (2008). Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 111, 3931–3940.

Tremblay, L.O., and Herscovics, A. (1999). Cloning and expression of a specific human alpha 1,2-mannosidase that trims Man9GlcNAc2 to Man8GlcNAc2 isomer B during N-glycan biosynthesis. *Glycobiology* 9, 1073–1078.

Trifa, A.P., Popp, R.A., Cucuianu, A., Bănescu, C., Tevet, M., Martin, B., Murat, M., Vesa, S.C., Dima, D., Căndea, M., et al. (2014). CALR versus JAK2 mutated essential thrombocythaemia - a report on 141 patients. *Br. J. Haematol.*

Turon, F., Cervantes, F., Colomer, D., Baiges, A., Hernández-Gea, V., and Garcia-Pagán, J.C. (2014). Role of calreticulin mutations in the etiological diagnosis of splanchnic vein thrombosis. *J. Hepatol.*

Uckun, F.M., Qazi, S., Ozer, Z., Garner, A.L., Pitt, J., Ma, H., and Janda, K.D. (2011). Inducing apoptosis in chemotherapy-resistant B-lineage acute lymphoblastic leukaemia cells by targeting HSPA5, a master regulator of the anti-apoptotic unfolded protein response
218

signalling network: Targeting UPR Network in Leukemia. *Br. J. Haematol.* *153*, 741–752.

Ugo, V., Marzac, C., Teyssandier, I., Larbret, F., Lécluse, Y., Debili, N., Vainchenker, W., and Casadevall, N. (2004). Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp. Hematol.* *32*, 179–187.

Upton, J.-P., Wang, L., Han, D., Wang, E.S., Huskey, N.E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M.T., Ruggero, D., Goga, A., et al. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science* *338*, 818–822.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* *287*, 664–666.

Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D.Y., and Nagata, K. (2008). ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science* *321*, 569–572.

Ushioda, R., Hoseki, J., and Nagata, K. (2013). Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress. *Mol. Biol. Cell* *24*, 3155–3163.

Vainchenker, W. (2016). Syndromes myéloprolifératifs non BCR-ABL : de l'initiation à l'activation de la voie JAK/STAT (Congrès de la Société Française d'Hématologie 2016).

Vainchenker, W., and Kralovics, R. (2017). Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* *129*, 667–679.

Vainchenker, W., Delhommeau, F., Constantinescu, S.N., and Bernard, O.A. (2011). New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* *118*, 1723–1735.

Van Leeuwen, J.E., and Kears, K.P. (1997). Reglucosylation of N-linked glycans is critical for calnexin assembly with T cell receptor (TCR) alpha proteins but not TCRbeta proteins. *J.*

Biol. Chem. 272, 4179–4186.

Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Rambaldi, A., Barosi, G., Marchioli, R., Marfisi, R.M., Finazzi, G., Guerini, V., Fabris, F., et al. (2007). Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 110, 840–846.

Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Pancrazzi, A., Guerini, V., Barosi, G., Ruggeri, M., Specchia, G., Lo-Coco, F., Delaini, F., et al. (2008). Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 112, 844–847.

Vannucchi, A.M., Rotunno, G., Bartalucci, N., Raugei, G., Carrai, V., Balliu, M., Mannarelli, C., Pacilli, A., Calabresi, L., Fjerza, R., et al. (2014). Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia*.

Vassilakos, A., Cohen-Doyle, M.F., Peterson, P.A., Jackson, M.R., and Williams, D.B. (1996). The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J.* 15, 1495–1506.

Verger, E., Cassinat, B., Chauveau, A., Dosquet, C., Giraudier, S., Schlageter, M.-H., Ianotto, J.-C., Yassin, M.A., Al-Dewik, N., Carillo, S., et al. (2015). Clinical and molecular response to interferon- α therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood* 126, 2585–2591.

Vigon, I., Mornon, J.P., Cocault, L., Mitjavila, M.T., Tambourin, P., Gisselbrecht, S., and Souyri, M. (1992). Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5640–5644.

Villamil Giraldo, A.M., Lopez Medus, M., Gonzalez Lebrero, M., Pagano, R.S., Labriola, C.A., Landolfo, L., Delfino, J.M., Parodi, A.J., and Caramelo, J.J. (2010). The structure of calreticulin C-terminal domain is modulated by physiological variations of calcium concentration. *J. Biol. Chem.* 285, 4544–4553.

- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1999). Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 9236–9241.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 1015–1068.
- Vollenweider, F., Kappeler, F., Itin, C., and Hauri, H.P. (1998). Mistargeting of the lectin ERGIC-53 to the endoplasmic reticulum of HeLa cells impairs the secretion of a lysosomal enzyme. *J. Cell Biol.* *142*, 377–389.
- Wada, I., Kai, M., Imai, S., Sakane, F., and Kanoh, H. (1997). Promotion of transferrin folding by cyclic interactions with calnexin and calreticulin. *EMBO J.* *16*, 5420–5432.
- Walter, P., and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* *91*, 551–556.
- Wang, C.-W., and Klionsky, D.J. (2003). The molecular mechanism of autophagy. *Mol. Med. Camb. Mass* *9*, 65–76.
- Wang, M., and Kaufman, R.J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 581–597.
- Wang, S., and Kaufman, R.J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell Biol.* *197*, 857–867.
- Wang, S.A., Hasserjian, R.P., Loew, J.M., Sechman, E.V., Jones, D., Hao, S., Liu, Q., Zhao, W., Mehdi, M., Galili, N., et al. (2006). Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia* *20*, 1641–1644.
- Weitzmann, A., Volkmer, J., and Zimmermann, R. (2006). The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of Sill1 function in man and mouse. *FEBS Lett.* *580*, 5237–5240.

Wijeyesakere, S.J., Gafni, A.A., and Raghavan, M. (2011). Calreticulin Is a Thermostable Protein with Distinct Structural Responses to Different Divalent Cation Environments. *J. Biol. Chem.* *286*, 8771–8785.

Wijeyesakere, S.J., Rizvi, S.M., and Raghavan, M. (2013). Glycan-dependent and -independent interactions contribute to cellular substrate recruitment by calreticulin. *J. Biol. Chem.* *288*, 35104–35116.

Williams, D.B. (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* *119*, 615–623.

Williams, D.M., Kim, A.H., Rogers, O., Spivak, J.L., and Moliterno, A.R. (2007). Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp. Hematol.* *35*, 1641–1646.

Woehlbier, U., and Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 329–337.

Wu, Y., Swulius, M.T., Moremen, K.W., and Sifers, R.N. (2003). Elucidation of the molecular logic by which misfolded alpha 1-antitrypsin is preferentially selected for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8229–8234.

Xu, C., and Ng, D.T.W. (2015). Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 742–752.

Yamaguchi, H., and Wang, H.-G. (2004). CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 45495–45502.

Yamaguchi, D., Kawasaki, N., Matsuo, I., Totani, K., Tozawa, H., Matsumoto, N., Ito, Y., and Yamamoto, K. (2007). VIPL has sugar-binding activity specific for high-mannose-type N-glycans, and glucosylation of the alpha1,2 mannosyl branch blocks its binding. *Glycobiology* *17*, 1061–1069.

Yamaguchi, D., Hu, D., Matsumoto, N., and Yamamoto, K. (2010). Human XTP3-B binds to alpha1-antitrypsin variant null(Hong Kong) via the C-terminal MRH domain in a glycan-dependent manner. *Glycobiology* 20, 348–355.

Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A.A., Koromilas, A.E., Zhou, L., Snider, M.D., Scheuner, D., Kaufman, R.J., et al. (2003). The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* 113, 519–531.

Ye, J., and Koumenis, C. (2009). ATF4, an ER stress and hypoxia-inducible transcription factor and its potential role in hypoxia tolerance and tumorigenesis. *Curr. Mol. Med.* 9, 411–416.

Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355–1364.

Ye, Y., Meyer, H.H., and Rapoport, T.A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J. Cell Biol.* 162, 71–84.

Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., and Rapoport, T.A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841–847.

Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., and Rapoport, T.A. (2005). Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14132–14138.

Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2, 1542–1552.

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J. Biol. Chem.* 281, 30299–30304.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* *107*, 881–891.

Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K., and Mori, K. (2003). A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response. *Dev. Cell* *4*, 265–271.

Zamanian, M., Veerakumarasivam, A., Abdullah, S., and Rosli, R. (2013). Calreticulin and Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* *19*, 149–154.

Zapun, A., Darby, N.J., Tessier, D.C., Michalak, M., Bergeron, J.J., and Thomas, D.Y. (1998). Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J. Biol. Chem.* *273*, 6009–6012.

Zhao, G., Zhou, X., Wang, L., Li, G., Schindelin, H., and Lennarz, W.J. (2007). Studies on peptide:N-glycanase-p97 interaction suggest that p97 phosphorylation modulates endoplasmic reticulum-associated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 8785–8790.

Zielinska, D.F., Gnad, F., Wiśniewski, J.R., and Mann, M. (2010). Precision Mapping of an In Vivo N-Glycoproteome Reveals Rigid Topological and Sequence Constraints. *Cell* *141*, 897–907.

Zinke, M., Nageswaran, V., Reinhardt, R., and Burmeister, T. (2015). Rapid and sensitive detection of calreticulin type 1 and 2 mutations by real-time quantitative PCR. *Mol. Diagn. Ther.* *19*, 329–334.